

**Thèse de doctorat de l'UNIVERSITÉ Paris DIDEROT –  
PARIS VII**

Ecole doctorale Hématologie Oncogénèse et Biothérapies

Présentée et soutenue publiquement par

**Selma BECHERIRAT**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'université Paris VII**

Spécialité : **Hématologie et Oncologie**

**Analyses sur modèles expérimentaux de cancers coliques  
de deux situations d'échecs d'un anti-angiogénique en  
adjuvant et en interruption thérapeutique**

Le 9 Novembre 2015

Thèse dirigée par le **Pr. Marc POCARD**

**Jury :**

**Pr. Thierry André**, Hôpital Saint-Antoine, Paris

**Dr. Gilles Pagès**, IRCAN, Nice et Centre Scientifique de Monaco

**Dr. Fabrice Soncin**, INSERM Institut de Biologie de Lille

**Dr. Virginie Dangles-Marie**, Institut Curie, Paris

**Pr. Marc Pocard**, INSERM Hôpital Lariboisière, Paris

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examinatrice**

**Directeur de thèse**



**« Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité,  
un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté »**

*Winston Churchill*

*A mes parents*

*A ma famille*

*A mon mari*



## Remerciements

Au **Pr. Thierry André**, vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et je vous prie de croire à ma plus profonde gratitude.

Au **Dr. Gilles Pagès**, vous m'avez fait l'honneur d'avoir pris connaissance de ce travail et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous prie de recevoir mes plus sincères remerciements.

Au **Dr. Fabrice Soncin**, vous m'avez fait l'honneur d'avoir pris connaissance de ce travail et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous en exprime toute ma gratitude.

Au **Dr. Virginie Dangles-Marie** vous m'avez fait l'honneur de siéger dans ce jury et je vous en suis profondément reconnaissante.

Au **Pr. Marc Pocard**, mon directeur de thèse, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour la confiance dont vous m'avez fait preuve, pour tout votre soutien et conseil, tout en me laissant une grande autonomie. Vous avez été pour moi d'une grande aide et d'une grande gentillesse. Vous vous êtes toujours rendu disponible (malgré un emploi du temps bien chargé). Soyez assurée de toute mon estime et mon profond respect.

Au **Dr. Fatemeh Valamanesh**, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, d'avoir toujours été à l'écoute et d'avoir trouvé les mots justes pour me soutenir. Ta persévérance dans l'aboutissement d'un projet est un exemple pour moi.

Mes remerciements vont également au **Dr. Jean-Philippe Brouland** dont l'aide et la disponibilité ont contribué de façon significative à la progression de ce travail de thèse.

Merci au **Pr. Amu therwath** pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir eu avec vous, pour vos suggestions et surtout pour votre aide et contribution dans l'écriture de mon article.

Au **Dr. Christian Billard** merci pour ta disponibilité et l'aide que tu m'as apporté.

Merci au **Pr. Jean-Marie Launay** pour votre aide précieuse.

Merci au **Dr. Nicolas Vodovar** pour tes conseils avisés.

A mes deux petites thésardes **Rose Hilal** « my lover » et **Diana Cifuentes** « ma Dianita » sans vous cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est. Merci pour ces fous rires et ces longues discussions. Au cours de ces années nous avons tissé des liens d'amitiés qui j'espère et j'en suis sûre se poursuivront encore longtemps. A Rose, merci pour ta gentillesse sans pareille et

ton oreille attentive. A Diana, à ta joie de vivre et ton grand cœur. Je vous souhaite bien du bonheur et que tout vos projets et vos rêves se réalisent.

Au nouveau **Dr. Samaher Besbes** tu auras ouvert le bal des soutenances cette année. Merci pour tes conseils qui m'ont souvent donné des « coups de stress » mais qui étaient toujours très pertinents.

Au nouveau **Dr. Chris Sorel Mantsouga** mon binôme de thèse, ca y'est on y est enfin arrivé ! Nous avons partagé les mêmes difficultés administratives de thèse ensemble. Je te souhaite une excellente suite professionnelle et personnelle.

Au **Dr. Marine Poittevin**, ma voisine de bureau pendant plus de 3 ans. Tu as été la première étudiante que j'ai croisée au laboratoire et à m'avoir « coaché », rien que pour ça merci ! Mais aussi pour la motivation et la joie de vivre que tu as répandu au laboratoire.

A **Gabrielle Mangin**, le relais est passé bon courage pour ces belles années ! Je suis certaine que tu vas assurer.

A **Cynthia Pimpie** notre perle technicienne. Je te remercie sincèrement pour ta patience, ta gentillesse et ton aide technique. Ce fut très agréable de travailler avec toi.

A la « team » 965 **Mojgan, Yasmine, Julie, Caro, Abdel, Réa, Henri, Hélène, Raphael, Chetana, Antony, Delphine**, vous avez été au laboratoire qu'un court moment mais nous avons partagé beaucoup de rigolades, de délires et parfois de moins bons moments. Mais partager avec vous vos premiers pas en recherche a été un réel plaisir. Vous avez aussi contribué de plus ou moins près à cette thèse. Votre bonne humeur a été un recours précieux. Un grand merci à vous.

Un merci également à la « team » 942 **Malha, Mathilde, Loubina, Fériel, Alice, Anaïs**, pour toutes les longues discussions échangées pendant les pauses sucrées et moments de détente, mais aussi pour m'avoir sortie d'affaires tant de fois.

Un grand merci à **Christine** et **Karima** pour votre gentillesse, votre dévouement et votre aide dans les démarches administratives mais surtout les commandes données à la dernière minute.

A **Patrice** et **Nathalie**, technicien du service d'anatomie et cytologie pathologiques, je vous remercie pour votre accueil et votre aide pour la réalisation des lames d'immunohistochimie.

Ce travail de recherche a été réalisé grâce au précieux soutien financier de la **fondation de France** et **fondation de l'avenir**. Que cette thèse soit l'expression de mes plus sincères remerciements.

Merci à **mes parents** sans qui tout ca n'aurait jamais été possible. Je leur dédie cet ouvrage qui clôt le chapitre de mes études. Avec toute ma reconnaissance.

Merci à toi **Brahim** pour ta patience et ton soutien. J'espère être digne de ta confiance et pouvoir te rendre la pareille « tout au long de notre vie » !

A tout ceux que j'ai cité sur cette page et tout ceux que j'ai oublié un grand merci...

Et enfin, j'ai une pensée particulière envers toutes les personnes qui se battent chaque jour contre le cancer.



# **SOMMAIRE**



<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>21</b>
<b>A- Le cancer colorectal.....</b>	<b>23</b>
I- Epidémiologie .....	23
II- Anatomie générale et organisation fonctionnelle du côlon .....	24
II-1. L'anatomie générale du côlon .....	24
II- 2. Organisation fonctionnelle des cryptes du côlon .....	26
III- Transformation cellulaire/développement tumoral .....	27
III-1. L'instabilité chromosomique ou CIN ( <i>Chromosomal INstability</i> ).....	30
III-2. L'instabilité microsatellitaire ou MSI ( <i>MicroSatellite Instability</i> ).....	31
III-3. Les Proto-oncogènes .....	31
III-4. Les gènes suppresseurs de tumeur.....	31
IV- Concept des Cellules Souches Cancéreuses.....	32
IV-1. Caractéristiques fonctionnelles des cellules souches.....	32
IV-2. L'origine du concept de cellules souches cancéreuses.....	33
IV-3. Caractérisation des cellules souches cancéreuses au sein du CCR.....	36
IV-4. Enjeu dans la prise en charge thérapeutique des tumeurs solides .....	37
V- Classification TNM et les bases thérapeutiques .....	39
V-1. Classification TNM .....	39
V-2. Prises en charge thérapeutique des CCR.....	41
a) Chirurgie .....	41
b) Chimiothérapie.....	42
c) Thérapies ciblées .....	43
<b>B – Réseau vasculaire et angiogenèse tumorale .....</b>	<b>45</b>
I- La néo-vascularisation dans le processus de développement tumoral .....	45
I-1. Les vaisseaux sanguins.....	45
I-2. Les différents processus de formation des néo-vaisseaux .....	46
I-3. L'angiogenèse tumorale .....	49
I-4. Les inducteurs et inhibiteurs naturels de l'angiogenèse .....	54
II- Les acteurs de l'angiogenèse tumorale.....	56
II-1. La grande famille du VEGF.....	56
a) Le PlGF.....	56
b) Le VEGF-B.....	56
c) Le VEGF-C et le VEGF-D .....	57
d) Le VEGF-A.....	57
e) Les récepteurs au VEGF.....	58
II-2. Le VEGF et l'angiogenèse tumorale .....	62
1) Le rôle du VEGF et de ses récepteurs.....	62
2) La régulation de l'expression du VEGF.....	63
3) Conséquences de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale .....	64
II-3. Rôle des MMPs dans l'angiogenèse tumorale .....	66
<b>C- Traitements et mécanismes de résistances aux anti-angiogéniques .....</b>	<b>68</b>
I- Les traitements anti-angiogéniques (inhibiteurs de la voie VEGF/VEGFR) .....	68
I-1. Les anticorps monoclonaux .....	68

I-2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase.....	70
I-3. Un récepteur hybride circulant du VEGF .....	72
II- Les mécanismes de résistances aux anti-angiogéniques .....	73
III- Prévenir les mécanismes de résistances aux AAG .....	78
III-1. Cibler plusieurs facteurs pro-angiogéniques .....	78
III-2. Cibler la voie de signalisation de l'HGF .....	78
III-3. L'hypoxie comme cible thérapeutique .....	79
<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....</b>	<b>81</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>85</b>
<b>Partie I.....</b>	<b>87</b>
Article 1 .....	87
Contexte scientifique et objectif.....	87
Résultats .....	89
Conclusion.....	91
<b>Partie II.....</b>	<b>126</b>
Contexte scientifique et objectif.....	126
Article 2 .....	129
Article 3 (en préparation).....	139
Matériels et méthodes.....	139
Résultats .....	142
Conclusion.....	148
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>163</b>
<b>PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>197</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>205</b>

# **LISTE DES ABREVIATIONS**



## **A**

**AAG** : Anti-AngioGénique  
**ADN**: Acide DésoxyriboNucléique  
**Ag**: Antigène  
**Ang-1**: angiopoïétine-1  
**ATP**: Adenosine 5'-TriPhosphate

## **B**

**BCA**: Acide Bicinchoninique  
**BMP**: Bone Morphogenetic Protein  
**BSA**: Bovine Serum Albumin

## **C**

**CCR**: Cancer ColoRectal  
**CCRM**: Cancer ColoRectal Métastatique  
**CEP**: Cellules endothéliales progénitrices  
**CIN**: Chromosomal Instability  
**CS**: Cellule Souche  
**CSI**: Cellule Souche Intestinale  
**CSC**: Cellule Souche Cancéreuse

## **E**

**EGF**: Epidermal Growth Factor  
**EGFR**: Epidermal Growth Factor Receptor  
**ELISA**: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
**ERK**: Extracellular-signal Regulated Kinase

## **F**

**FAK**: Focal Adhesion Kinase  
**FGFb**: basic Fibroblast Growth Factor  
**Flk-1**: Fetal Liver Kinase-1  
**Flt-1&4**: Fms-Like Tyrosine kinase-1 et 4  
**FOLFIRI**: Folinic acid-Fluorouracil-Irinotecan  
**FOLFOX**: Folinic acid-Fluorouracil-Oxaliplatin

## **G**

**G-CSF**: Granulocyte Colony Stimulating Factor  
**GIST**: GastroIntestinal Stromal Tumor  
**GM-CSF**: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

## **H**

**HES** : Hématoxyline-Eosine-Safran  
**HGF**: Hepatocyte Growth Factor

**HIF**: Hypoxia Inducible Factor  
**HRE** : Hypoxia Response Element  
**HRP**: Horse Radish Peroxidase

## **I**

**IFL**: Irinotecan-Fluorouracil-Leuvocorin  
**IGF**: Insulin Growth Factor  
**IL**: Interleukin  
**INCA**: Institut National du Cancer

## **K**

**KDR**: Kinase insert Domain-containing Receptor

## **L**

**LAM**: Leucémie Aigüe Myéloïde  
**LOH**: Loss Of Heterozygosity

## **M**

**MEC**: Matrice Extra-Cellulaire  
**MMP**: Matrix MetalloProteinases  
**MSI**: (MicroSatellite Instability)

## **N**

**NOD/SCID**: NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency

## **P**

**PBS**: Phosphate Buffer Saline  
**PDGF**: Platelet-derived Growth Factor  
**PI3K**: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase  
**PLC-γ**: PhosphoLipase C-γ

## **S**

**SDF-1** : Stromal cell-derived factor-1  
**SDS**: Sodium Dodecyl Sulfate  
**SG**: Survie Globale  
**SSP**: Survie Sans Progression

## **T**

**TGF**: Transforming Growth Factor  
**TNFα**: Tumor Necrosis Factor α  
**TNM**: Tumor-Node-Metastasis

**VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR**: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

**5-FU**: 5-Fluoro-Uracile



# **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**



## Liste des figures

Figure 1. Segments constituant le côlon.....	24
Figure 2. Les différentes couches de la paroi du côlon.....	25
Figure 3. Organisation structurelle des cryptes du côlon. ....	27
Figure 4. Modifications acquises au cours de la tumorigenèse selon Hanahan et Weinberg (2011). .....	30
Figure 5. Division et auto-renouvellement des cellules souches. ....	34
Figure 6. Modèles stochastique et hiérarchique de prolifération tumorale. ....	35
Figure 7. Intégration de la théorie des CSC dans le traitement des tumeurs solides. ....	39
Figure 8. Illustration schématique des différents stades tumoraux. ....	41
Figure 9. EGFR et molécules thérapeutiques dans le cadre du CCR. ....	44
Figure 10. Réseau vasculaire .....	47
Figure 11. Etapes de l'angiogenèse. ....	52
Figure 12. Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux.....	54
Figure 13. Signalisation intracellulaire médiée par le VEGFR-2.....	61
Figure 14. Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs.....	62
Figure 15. La signalisation de l'hypoxie. ....	65
Figure 16. Mécanismes d'action des agents dirigés contre la voie VEGF/VEGFR.....	72
Figure 17. Les deux modes de résistances aux traitements AAG.....	74
Figure 18. Les quatre types de résistances adaptatives aux traitements AAG. ....	77
Figure 19. Schéma thérapeutique testant l'arrêt du bevacizumab. ....	88
Figure 20. Coloration HES d'une micro-métastase obtenue à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14.....	128
Figure 21. Dosage de l'ACE à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14. .....	128
Figure 22. Modèle de greffe orthotopique de CCR avec reprise chirurgicale. ....	140
Figure 23. Schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole.....	141
Figure 24. Photographies de tumeurs obtenues après autopsies des souris. ....	142
Figure 25. Coloration HES des tumeurs. ....	145

<b>Figure 26. Métastase ganglionnaire marquée au CK AE1-AE3.....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 27. Dosage radio-immunologique du VEGF dans le plasma. ....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 28. Dosage radio-immunologique du PlGF dans le plasma. ....</b>	<b>147</b>
<b>Figure 29. Dosage radio-immunologique de l'HGF dans le plasma.....</b>	<b>147</b>

### **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1. Ensemble des marqueurs permettant de discriminer les CS et les CSC.....</b>	<b>37</b>
<b>Tableau 2. Autopsie à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14. ....</b>	<b>127</b>
<b>Tableau 3. Récapitulatifs des résultats obtenus après autopsie et études immuno-histochimiques. .....</b>	<b>143</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**



## A- Le cancer colorectal

### I- Epidémiologie

L'incidence du cancer colorectal (CCR) dans le monde est extrêmement variable selon les pays, les pays riches et industrialisés sont les plus concernés par ce cancer avec une forte fréquence dans le nord et l'Ouest de l'Europe (Cancer Mondial, <http://www-dep.iarc.fr/>). Chaque année, environ un million de nouveaux cas de cancer colorectaux sont diagnostiqués dans le monde, avec plus de 500 000 décès par an (Jemal et al. 2009; Jemal et al. 2011; Labianca et al. 2010). Ainsi l'analyse des chiffres montre qu'en 2012, le nombre de nouveaux cas de CCR a été estimé à près de 746 000 chez les hommes et 614 000 chez les femmes, environ 700 000 personnes en sont décédées pour les 2 sexes confondus. Ces données en font la seconde cause de décès due au cancer dans le monde (Cancer Mondial, <http://www-dep.iarc.fr/>).

En France, sa fréquence le place en 3<sup>ème</sup> position pour les deux sexes confondus, après les cancers du sein et de la prostate. Chez la femme, c'est la 2<sup>nd</sup> localisation après le cancer du sein, avec une incidence de 18 926 nouveaux cas en 2012. Chez l'homme, c'est la 3<sup>ème</sup> localisation après le cancer de la prostate et du poumon, avec une incidence de 23 226 nouveaux cas en 2012. C'est aussi le 2<sup>ème</sup> cancer en terme de décès annuel, 17 722 décès, devant le cancer du poumon pour 29 949 décès (Inca, 2013). Depuis 20 ans, son incidence est en constante augmentation, due en partie au vieillissement de la population. L'augmentation moyenne de l'incidence calculée sur la période 1978-2000 est d'environ 1 % par an ce qui permet d'établir une projection de 45 000 nouveaux cas annuels en 2020 en France.

Le pronostic est étroitement lié au stade de développement de la maladie, au moment du diagnostic. Selon les données américaines, le taux de survie à 5 ans des patients diagnostiqués en 1999-2005 est de 90,8 % pour le stade local contre 69,5 % pour le stade régional (avec envahissement ganglionnaire) et 11,3 % pour le stade métastatique ("SEER Cancer Statistics Review 1975-2006 - Previous Version - SEER Cancer Statistics" 2015).

Néanmoins, si la survie globale s'est allongée de manière significative au cours de la dernière décennie, le CCR représente toujours un problème majeur de santé publique par sa fréquence, sa gravité ainsi que son coût.

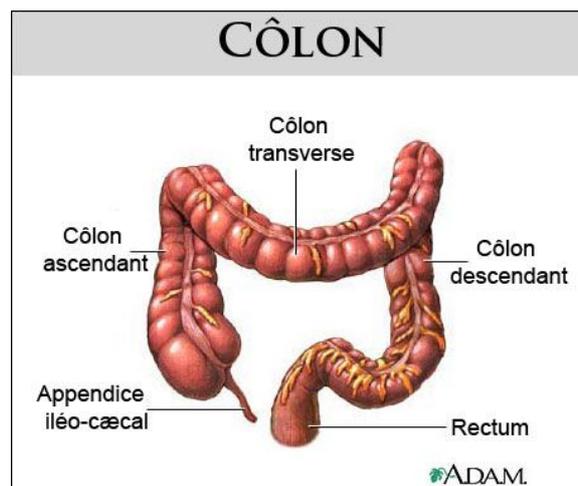
## II- Anatomie générale et organisation fonctionnelle du côlon

Le CCR se développe aux dépens de la muqueuse colique ou rectale. Le rectum sous-péritonéal, dépourvu de péritoine viscéral (ou séreuse), sera volontairement écarté de la description. En effet, sa vascularisation et son drainage lymphatique particulier lui offrent des possibilités de diffusion différentes de celles du côlon.

### II-1. L'anatomie générale du côlon

Le côlon s'étend de la valvule iléo-caecale (ou valvule de Bauhin) à la jonction recto-sigmoïdienne. Il se divise en quatre segments (Figure 1) :

- le côlon ascendant,
- le côlon transverse,
- le côlon descendant,
- le côlon sigmoïde.



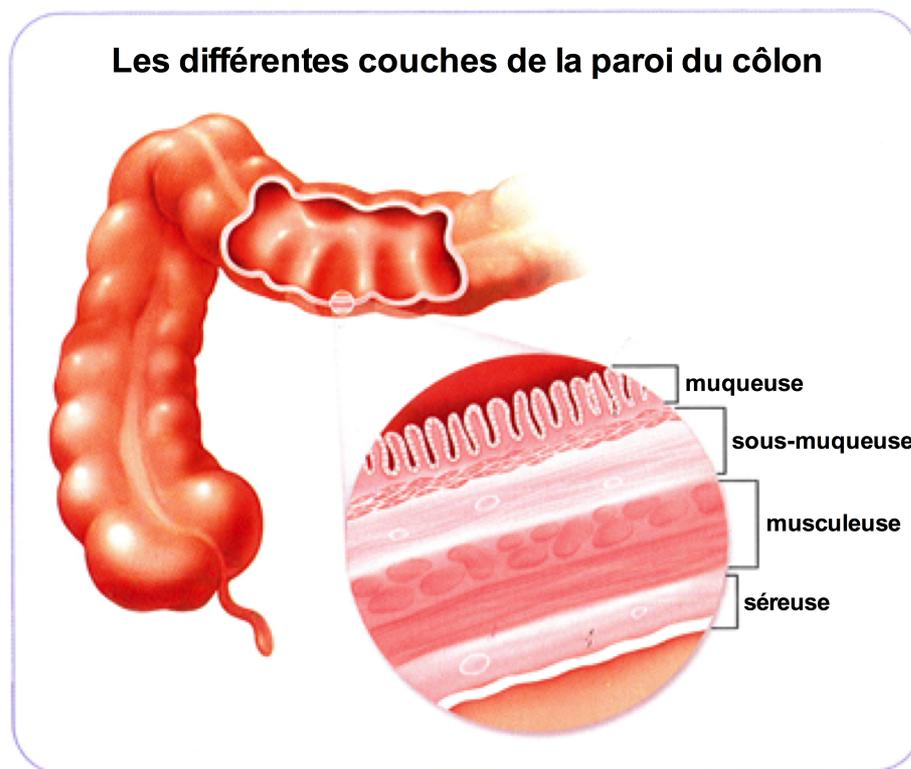
**Figure 1. Segments constituant le côlon.**

Source : [www.health.allrefer.com](http://www.health.allrefer.com)

La paroi colique est formée de quatre couches différentes (Figure 2) qui se superposent (de

l'intérieur vers l'extérieur) :

- La muqueuse, composée d'un épithélium de revêtement (constitué par des cellules caliciformes ou cellules sécrétrices de mucus, des entérocytes ou colonocytes et des cellules entéro-endocrines) s'invaginant en cryptes. Cette couche de cellules est supportée par un tissu conjonctif, appelée le chorion ou *lamina propria* (rôle de soutien) riche en tissu lymphoïde diffus et de fibres musculaires formant la musculaire muqueuse.
- La sous-muqueuse, constituée par un tissu conjonctif richement irrigué et contenant le plexus nerveux autonome de Meissner.
- La musculuse, avec une disposition en deux couches de fibres musculaires lisses : circulaire (interne) et longitudinale (externe). Entre ces couches, se situe le plexus nerveux d'Auerbach.
- La séreuse ou l'adventice, tunique externe constituant le feuillet viscéral du péritoine, constitué de tissu adipeux.



**Figure 2. Les différentes couches de la paroi du côlon.**

La paroi colique est composée par la superposition de quatre couches : muqueuse, sous-muqueuse, musculuse et séreuse. (Schéma d'après l'Institut national du cancer)

## II- 2. Organisation fonctionnelle des cryptes du côlon

De par la rapidité de renouvellement de son épithélium, le côlon est considéré comme un organe remarquable. Il est en contact avec un milieu septique, acide et agressif qui impose un renouvellement rapide du revêtement muqueux, siège des échanges entre la lumière colique et la vascularisation portale. Cet épithélium est en effet renouvelé tous les 5 jours.

La muqueuse du côlon est organisée en deux couches distinctes. A la surface de la lumière intestinale se trouve la couche épithéliale, formée par une simple couche de cellules cylindriques hautes, formant des invaginations. Cette couche de cellules est supportée par un tissu conjonctif appelé le chorion ou la *lamina propria*, l'ensemble formant l'unité fonctionnelle du côlon appelé crypte de Lieberkühn, chacune contenant 2000 à 3000 cellules. Il a été estimé que plus de  $6 \times 10^{14}$  colonocytes seraient produits au cours de la vie d'un individu (Radtke and Clevers 2005).

Dès la naissance, se constitue le compartiment cryptique dans lequel résident les cellules prolifératives, les progéniteurs et les cellules souches. Les cellules différenciées localisées au sommet des cryptes sont éliminées dans la lumière du côlon. Ces cellules différenciées dérivent de cellules souches multipotentes retrouvées au fond des cryptes intestinales (Figure 3), en moyenne au nombre de 7 par crypte. Suite à une division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à un progéniteur destiné à se différencier. Il est bien établi que les cellules souches intestinales donnent naissance aux trois types de cellules épithéliales différenciées : les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines et les entérocytes. L'homéostasie de l'épithélium intestinal est donc assurée grâce à un équilibre entre la production des cellules différenciées, leur migration le long de la villosité vers la lumière intestinale, et leur élimination par apoptose (mort cellulaire programmée) et/ou une autre forme de mort cellulaire, l'anoïkose (Bjerknes and Cheng 2005; Boman and Huang 2008; Humphries and Wright 2008).

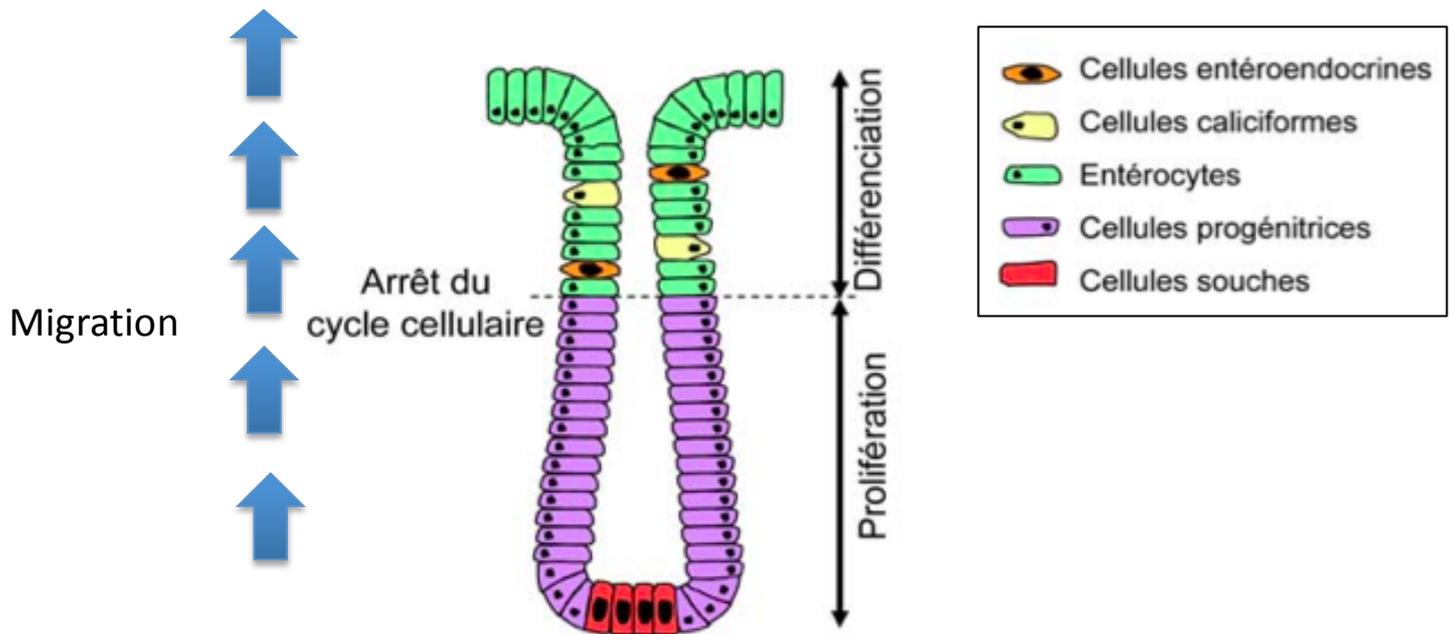
La muqueuse épithéliale est constituée de trois types de cellules différenciées :

- les cellules sécrétrices de mucus ou cellules caliciformes ou en gobelet (20 %) sécrétant le mucus tapissant l'épithélium et le protégeant des toxines et bactéries du tube digestif,
- les cellules entéro-endocrines (< 1 %) sécrétant les peptides gastro-intestinaux. Ces

dernières ont pour particularité de dériver de la crête neurale,

- les entérocytes ou colonocytes (80 %) assurant l'absorption des nutriments et le transport des électrolytes.

Il est à noter que contrairement à l'intestin grêle, le côlon est dépourvu de cellules de Paneth.



**Figure 3. Organisation structurelle des cryptes du côlon.**

Le côlon présente un épithélium polarisé avec des cellules prolifératives localisées à la base des cryptes. Les cellules souches entretiennent ce compartiment prolifératif par leurs descendants immédiats, les progéniteurs. Au fur et à mesure que les cellules migrent le long de la villosité (partie apicale), les cellules donnent naissance aux trois types de cellules différenciées, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines et les entérocytes. Une fois dans la lumière intestinale, elles desquament par apoptose (Brabletz, Schmalhofer, and Brabletz 2009). (Schéma adapté de Sancho, Batlle, and Clevers 2004)

### III- Transformation cellulaire/développement tumoral

Une cellule cancéreuse se caractérise par l'acquisition d'un certain nombre de propriétés, notamment une prolifération incontrôlée, l'envahissement des tissus adjacents et la colonisation des organes à distance. L'acquisition de ces caractéristiques correspond au processus de transformation : le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse. Le cancer se développe suite à l'accumulation de plusieurs altérations de l'ADN (Bishop 1991)

sous l'effet de divers facteurs (génétiques, héréditaires, chimiques, physiques, biologiques et alimentaires) qui provoque l'apparition et la progression de la tumeur. Ces altérations permettent la croissance néoplasique au phénotype caractéristique tel que celui décrit par Hanahan & Weinberg (Figure 4). En effet, en 2000 Hanahan et Weinberg (Douglas Hanahan and Weinberg 2000) ont proposé que la formation de tumeur nécessite l'acquisition de 6 propriétés cellulaires :

- 1- ***Autosuffisance en signaux de croissance.*** La tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin de ne pas dépendre totalement de son microenvironnement.
- 2- ***Insensibilité aux signaux inhibant la croissance.*** La prolifération des cellules est contrôlée au niveau du cycle cellulaire. Il existe des signaux qui bloquent le cycle cellulaire. Les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux afin de proliférer.
- 3- ***Potentiel répliatif illimité.*** Bien qu'étant dotées de capacité répliatives élevées, les cellules finissent toujours par arrêter de se multiplier par un mécanisme appelé sénescence. Celui-ci semble être en partie dépendant de l'érosion des télomères qui progressent au fur et à mesure des cycles de divisions. Une des caractéristiques des cellules tumorales est de limiter l'érosion des télomères et d'échapper ainsi aux mécanismes de sénescence. Cela permet aux cellules tumorales d'avoir la capacité de proliférer indéfiniment.
- 4- ***Echappement à l'apoptose.*** Parallèlement à la prolifération, l'inhibition de l'apoptose contribue également à l'expansion d'une population cellulaire. Les tumeurs doivent devenir insensibles aux signaux initiant ce mécanisme.
- 5- ***Induction de l'angiogenèse.*** Les cellules nécessitent un apport en oxygène et en nutriments afin de survivre. Cet apport se fait par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Lorsque la tumeur devient volumineuse, elle nécessite une irrigation plus importante. Elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par un mécanisme appelé angiogenèse.
- 6- ***Invasion des tissus et métastases.*** Durant le développement de la plupart des tumeurs, des cellules vont se détacher de la tumeur et être à l'origine de la formation de tumeurs dans d'autres organes. C'est cette dernière étape qui est souvent fatale au patient.

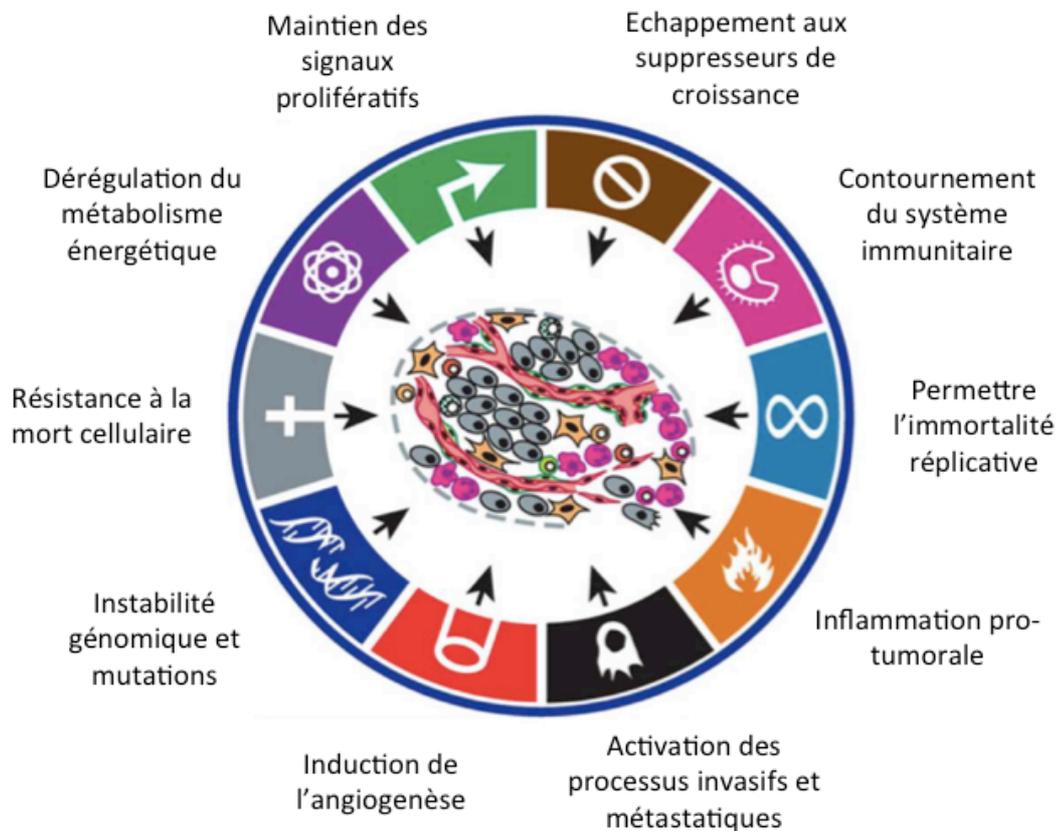
En 2011 (Douglas Hanahan and Weinberg 2011), avec l'ensemble des recherches effectuées sur les différents types de cancers, ils ont enrichi cet ensemble de caractéristiques par deux autres altérations générales que doivent acquérir les cellules tumorales et deux autres

particularités nécessaires liées.

- 7- **Dérégulation du métabolisme énergétique.** Les cellules cancéreuses favorisent la glycolyse même en présence d'O<sub>2</sub> pour produire leur énergie malgré un plus faible rendement en adénosine 5'-triphosphate (ATP) par rapport à la phosphorylation oxydative. Ce changement leur confère un avantage prolifératif. En effet, donner la priorité à la glycolyse permet l'exploitation des intermédiaires glycolytiques nécessaires dans les différentes voies de biosynthèse lors de la formation de nouvelles cellules.
- 8- **Contournement du système immunitaire.** Au cours de l'évolution tumorale, on observe un changement des caractéristiques immunologiques de la tumeur et du système immunitaire chargé de la surveiller et de la contrôler. Ces changements permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à la surveillance du système immunitaire.
- 9- **Instabilité et mutation du génome.** Les mutations génétiques sont des événements moteurs de la progression de l'oncogenèse, c'est pourquoi l'instabilité génétique est retrouvée dans la plupart des cancers.
- 10- **Inflammation.** L'inflammation tumorale est induite par des facteurs inflammatoires sécrétés par les cellules tumorales, qui recrutent des macrophages au sein de la tumeur. Elle se comporte ainsi comme un puissant promoteur tumoral : elle permet une progression plus rapide de l'oncogenèse. La prolifération et la survie qui sont déjà suractivées dans les cellules cancéreuses, sont stimulées par l'inflammation.  
L'inflammation occupe donc une position importante dans la progression de l'oncogenèse.

L'hypothèse expliquant la tumorigenèse repose sur la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Selon cette hypothèse, l'apparition de tumeur s'explique par la mutation sur des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Dans les CCR, il existe principalement 2 types d'instabilité génomique associés à ce phénotype : l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI) (Worthley et al. 2007).

Le développement du CCR se réalise donc en plusieurs étapes mettant en jeu une accumulation de mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes.



**Figure 4. Modifications acquises au cours de la tumorigenèse selon Hanahan et Weinberg (2011).**

Selon cette théorie les cellules doivent accumuler 10 modifications, quel que soit le moyen, pour former un cancer. Ceci serait commun pour la plupart, voire la totalité des cancers.

### III-1. L'instabilité chromosomique ou CIN (*Chromosomal INstability*)

Il s'agit de la classe la plus fréquente d'instabilité génomique observée dans le CCR (85 %). Elle est caractérisée par des réarrangements chromosomiques, des anomalies numériques (Lengauer, Kinzler, and Vogelstein 1997; Migliore et al. 2011) et par la survenue fréquente de pertes alléliques de gènes suppresseurs de tumeurs (p53, MYH et APC) (Markowitz and Bertagnolli 2009). La conséquence de l'instabilité chromosomique est un déséquilibre du nombre de chromosomes et une fréquence importante d'une perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity) (Pino and Chung 2010).

### III-2. L'instabilité microsatellitaire ou MSI (*MicroSatellite Instability*)

La voie MSI concerne 15 à 20 % des CCR. Elle est, quant à elle, caractérisée par la substitution de base ou par des insertions ou délétions engendrant un décalage du cadre de lecture, souvent causée par la perte de réparation des mésappariements de l'ADN, le MMR (MisMatch Repair) (Boland and Goel 2010). Elle conduit à l'accumulation de mutations dans des gènes contrôlant l'apoptose et le cycle cellulaire (TGF $\beta$ RII, BAX ou Caspase5).

### III-3. Les Proto-oncogènes

Ce sont des gènes codant pour des protéines participant à la régulation de la prolifération cellulaire. Ces protéines, qu'elles soient facteurs de croissance, récepteurs, protéines de transduction du signal ou facteurs de transcription, ont en temps normal une activité contrôlée. Une fois mutés par gain de fonction, ils entraînent une prolifération exagérée et incontrôlée des cellules. La mutation d'un seul des deux allèles du gène est suffisante pour activer un oncogène. Les mutations somatiques sur ces gènes codant certains partenaires des voies de signalisation sont fréquentes, comme pour le gène codant la sous-unité catalytique de la PI3K (phosphatidyl-inositol 3 kinase) (muté dans 32 % des cas) et les gènes codant la protéine BRAF et la protéine KRAS, mutés respectivement dans 15 et 40 % des CCR (Velho and Haigis 2011). Les mutations du gène KRAS ont été fortement associées avec la résistance au traitement par l'anticorps monoclonal anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

### III-4. Les gènes suppresseurs de tumeur

Contrairement aux oncogènes, ils ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Dans le processus de carcinogénèse, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leurs fonctions. Parmi ceux-ci :

- Le gène *APC* joue un rôle clé dans la voie de signalisation Wnt en favorisant la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Goss and Groden 2000; Minde et al. 2011). Cette voie joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires incluant l'adhésion, la migration, l'organisation du cytosquelette et la ségrégation chromosomique. L'activation de la voie Wnt est désormais considérée comme un événement précoce dans la cancérogenèse colorectale. La mutation de ce gène est retrouvée dans 80 % des CCR.

- Le gène *MYH* code pour une protéine impliquée dans le système de réparation de l'ADN par excision de base qui permet de réparer les lésions oxydantes de l'ADN, appelé BER (*Base Excision Repair*). Les patients porteurs d'une mutation bi-allélique de ce gène présentent le même profil phénotypique et évolutif que les patients atteints du syndrome de Lynch ou de la polypose adénomateuse familiale atténuée. Cependant, cette anomalie n'est retrouvée que dans un type de cancer héréditaire, la polypose associée à MYH (MAP, *MYH-Associated Polyposis*), la découverte de son implication dans CCR est récente (Enholm et al. 2003).
- Le gène *TP53* ou gardien du génome humain, est un facteur de transcription activé en réponse aux stress cellulaires tels que l'activation d'oncogènes, la présence de dommages de l'ADN, le raccourcissement des télomères ou encore d'hypoxie (Fearon 2011). La voie p53 agit comme un point de contrôle crucial dans le maintien de la stabilité du génome et de l'homéostasie cellulaire. La plupart des réponses induites par p53 interviennent directement ou indirectement dans la suppression de la tumeur. Approximativement, 85 % des mutations du gène *P53* dans le CCR sont des faux-sens.

## IV- Concept des Cellules Souches Cancéreuses

La théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) a émergé dans les années 2000, de la comparaison faite entre les mécanismes moléculaires permettant l'auto-renouvellement des cellules souches (CS) normales et les propriétés des cellules tumorales. Les CS normales sont définies comme une sous population cellulaire rare, qui possède la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en différents types de cellules matures. Une hypothèse a été émise selon laquelle les CSC formeraient une sous population réduite et relativement indifférenciée, probablement issue de la cancérisation des CS normales et dont la prolifération et la différenciation, seraient à l'origine de la masse tumorale (Reya et al. 2001).

### IV-1. Caractéristiques fonctionnelles des cellules souches

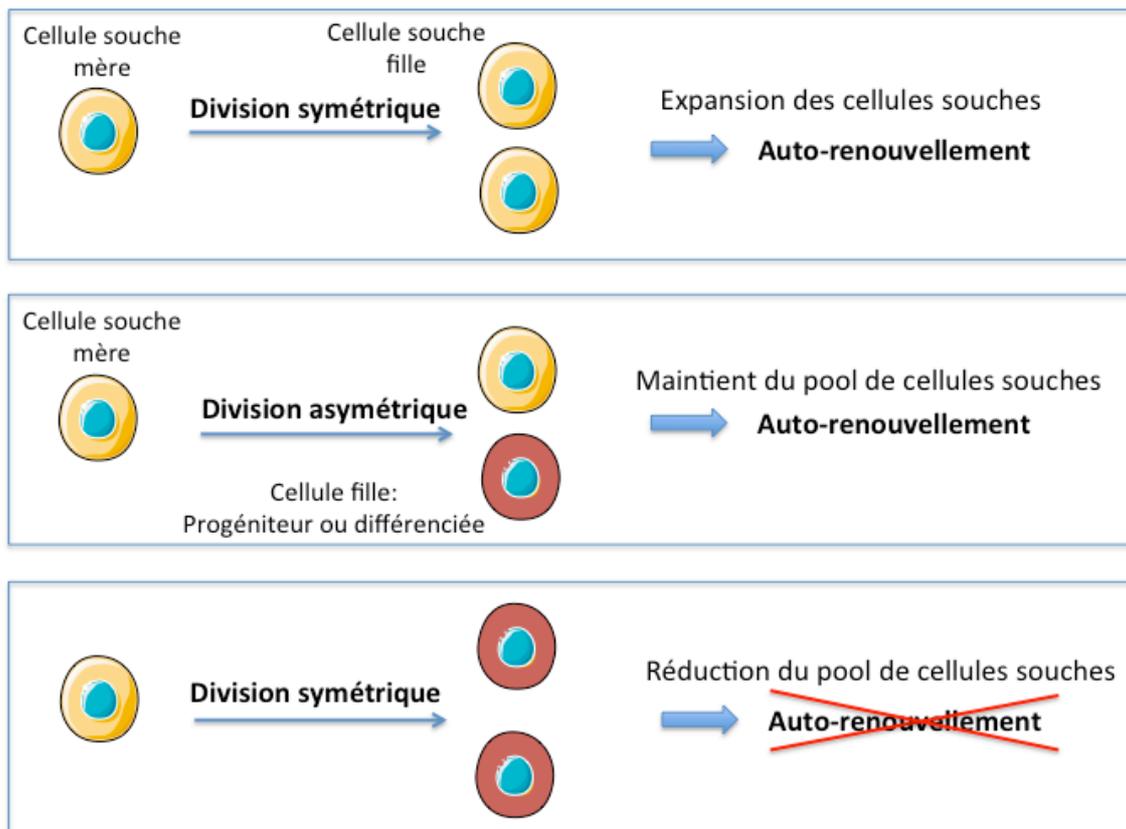
Les cellules souches intestinales (CSI) localisées au fond des cryptes intestinales sont responsables du renouvellement de l'épithélium colique. Les CS peuvent se diviser de 2 manières ; par division symétrique mais aussi par division asymétrique. Lors de la **division**

**symétrique**, la CS produit 2 cellules filles identiques entre elles et à la cellule mère. Au cours de la **division asymétrique**, la CS engendre une nouvelle CS fille (par auto-renouvellement) et, simultanément, génère une cellule fille déterminée à se différencier. Ces cellules filles issues de division asymétrique transiteront vers le sommet de la crypte intestinale, proliféreront et se différencieront en cellules fonctionnelles (Boman and Huang 2008). Ces CSI possèdent une durée de vie longue et sont ainsi responsables du renouvellement cellulaire tout au long de la vie de l'individu. Elles sont définies par deux caractéristiques fonctionnelles: la capacité d'auto-renouvellement ainsi que la multipotentialité, correspondant à la capacité de générer l'ensemble des cellules constituant le tissu d'où elles proviennent (Anderson et al. 2011). Dans le développement normal, la question d'auto-renouvellement est centrale. Afin d'entretenir un pool et de conserver une aptitude à produire des nouvelles cellules, une CS doit garder la capacité de s'auto-renouveler par division symétrique ou asymétrique et donner naissance au moins à une cellule fille qui possède les mêmes capacités qu'elle. Si la CS prolifère mais ne s'auto-renouvelle pas, le pool de CS sera appauvri (Figure 5).

Dans le cadre de l'épithélium colique, l'existence de deux pools de CSI a été suggérée : un pool de CSI quiescentes servant de réserve (Buczacki, Davies, and Winton 2011) et au contraire, un pool de CSI activées, « cyclantes » (c'est-à-dire actives au niveau du cycle cellulaire) prêtes à recevoir et répondre à des signaux de régulation provenant des cellules stromales (Scoville et al. 2008).

#### **IV-2. L'origine du concept de cellules souches cancéreuses**

Une tumeur est un tissu composé de cellules très hétérogènes en terme de morphologie, d'expression de marqueurs, de capacité de prolifération et de potentiel tumorigénique. Son développement peut être vu comme une version aberrante d'un tissu normal. Deux modèles conceptuels de l'origine et de la progression tumorale ont été proposés pour rendre compte de cette hétérogénéité. Le plus ancien, le **modèle stochastique** établi qu'une tumeur peut provenir de la cancérisation de n'importe qu'elle cellule de l'organisme qui aurait accumulé aléatoirement certaines mutations. D'après ce modèle, les cellules de la tumeur forment un groupe homogène également tumorigène, qui possèdent toutes le même potentiel de prolifération (Ginestier et al. 2007; Takebe et al. 2011).



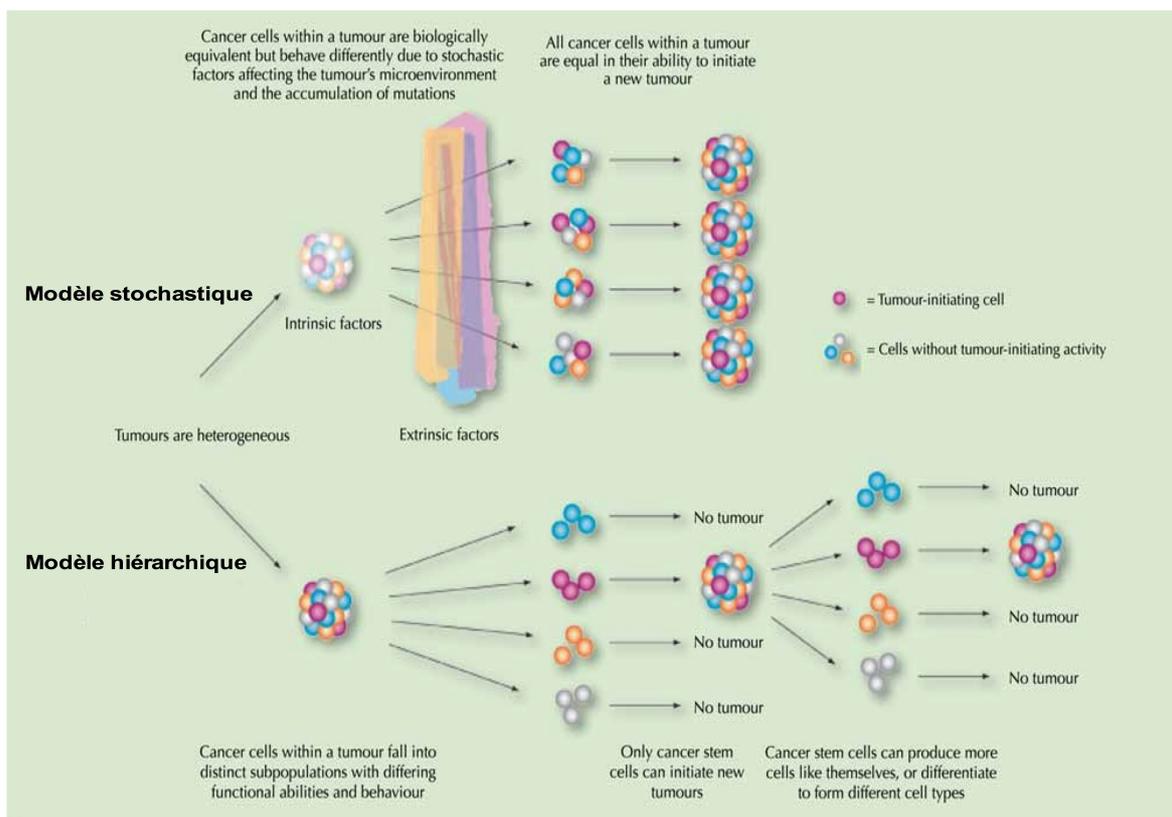
**Figure 5. Division et auto-renouvellement des cellules souches.**

Les divisions symétriques ou asymétriques permettent de maintenir un pool de CS par auto-renouvellement. La division symétrique d'une CS en 2 cellules filles progéniteurs ou cellules différenciées ne permet pas de maintenir l'auto-renouvellement et donc entraîne la diminution du pool de CS.

Le **modèle hiérarchique** quant à lui, ou encore « le concept des cellules souches » suggère que seulement une faible proportion de cellules au sein de la tumeur possède la capacité à l'initier et serait responsable de la croissance tumorale (Ieta et al. 2008). Cette hypothèse a pris naissance dans les années 90, après l'observation que seule 0,001% à 1% des cellules leucémiques sont capables de former des colonies *in vitro* ou *in vivo* (Reya et al. 2001). Il a aussi été démontré que les cellules de leucémie humaine possédant un phénotype  $CD34^+CD38^-$  sont au moins 100 fois plus tumorigéniques que les cellules  $CD34^+CD38^+$  lorsqu'elles sont injectées à des souris NOD/SCID (*NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficient*). Les CSC de leucémie possèdent, de plus, la capacité de se différencier et expriment différents marqueurs de lignées hématopoïétiques, et leur descendance reproduit l'hétérogénéité du cancer d'origine. Enfin, ces CSC peuvent être passées en souris NOD/SCID, ce qui prouve leur potentiel d'auto-renouvellement illimité. De même que les cellules souches normales, les CSC de leucémie forment une sous-population rare, ainsi les

cellules  $CD34^+CD38^-$  représentent environ 0.2% des cellules d'une leucémie myéloïde aiguë (D. Bonnet and Dick 1997; Lapidot et al. 1994). La découverte de ces CS leucémiques représente un des événements initiateurs de la recherche des CSC dans d'autres types de tumeurs, en particulier les tumeurs solides. Une hiérarchie cellulaire est alors suggérée, basée sur la présence de CSC qui prolifèrent et génèrent l'ensemble des cellules de la tumeur (Figure 6).

Concernant le CCR, l'hypothèse la plus répandue actuellement concernant l'origine de ces CSC serait qu'elles dériveraient de CS présentes à la base même des cryptes de Lieberkühn. Ces CS saines subiraient des mutations qui pourraient s'accumuler tout au long des années voire des décennies. Une fois transformées, ces cellules mutées donneraient naissance à des CSC (Abdul Khalek, Gallicano, and Mishra 2010).



**Figure 6. Modèles stochastique et hiérarchique de prolifération tumorale.**

Modèle stochastique : toutes les cellules de la tumeur possèdent le même potentiel tumorigénique, la progression tumorale est due à des mutations aléatoires qui confèrent à la cellule mutée un avantage prolifératif. Modèle hiérarchique : un sous-groupe de cellules tumorales agressives, les « cellules souches cancéreuses », possède la capacité de s'auto-renouveler et constitue la masse tumorale en proliférant asymétriquement (Schéma adapté de Dick 2008)

### **IV-3. Caractérisation des cellules souches cancéreuses au sein du CCR**

Les CSC dans le CCR montrent des propriétés similaires aux CSI: l'auto-renouvellement, la multipotentialité, la prolifération quasi-illimitée dans le temps et l'état souche (Schatton, Frank, and Frank 2009). De plus, ces CSC seraient caractérisées par l'expression de marqueurs de cellules souches embryonnaires dont Oct4, Sox2 et Klf4 (Schoenhals et al. 2009). Tout comme les CSI, les CSC sont définies par l'auto-renouvellement tout en maintenant une capacité à engendrer une progéniture aussi bien tumorigénique que non-tumorigénique au travers de la division asymétrique (Figure 5). Il est désormais admis qu'une série de mutations peut s'accumuler au cours des années voire des décennies au sein des CSI présentes à la base même des cryptes intestinales. Une fois transformées, les CSI mutées se divisent de manière symétrique et asymétrique pour donner lieu à d'autres CSC ou des progéniteurs qui génèrent eux-mêmes des cellules cancéreuses. Ces mutations contribueraient à des anomalies de contrôle et une activation anarchique ou au contraire à une répression de certaines voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des CS (Boman and Huang 2008; Horst et al. 2009).

Cependant, les CSC possèdent deux propriétés supplémentaires : la capacité d'initier une tumeur *in vivo* ainsi qu'une certaine capacité à résister aux traitements. Afin de les identifier et de les discriminer des CS saines, de nombreuses études ont été menées pour caractériser au mieux ces CSC dans le but de trouver des marqueurs spécifiques de celles-ci. Un certain nombre de marqueurs « généralistes » de CSC ont été identifiés dont certains sont encore controversés comme par exemple le CD133 (Tableau 1).

**Tableau 1. Ensemble des marqueurs permettant de discriminer les CS et les CSC.**  
(Todaro et al. 2010)

	Marqueur	Fonction
<b>Cellules souches saines de l'intestin</b>	CD133	Auto-renouvellement
	Musashi-1	Protéine de liaison à l'ADN
	Hes-1	Répresseur transcriptionnel
	Bmi-1	Protéine répresseur
	LGR5	Non connue, cible de Wnt
	CD29	Molécule d'adhésion
<b>Cellules souches cancéreuses</b>	CD133	Auto-renouvellement, angiogenèse tumorale
	CD44	Molécule d'adhésion
	CD166	Molécule d'adhésion
	EpCAM	Molécule d'adhésion
	ALDH1	Enzyme
	CD24	Molécule d'adhésion
	CD29	Molécule d'adhésion
	LGR5	Non connue, cible de Wnt

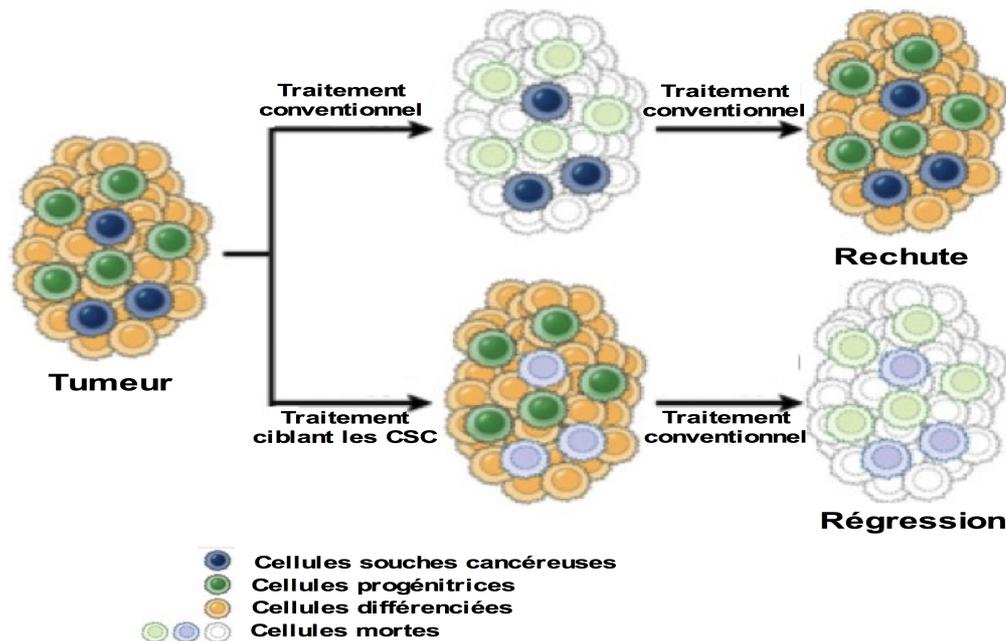
#### IV-4. Enjeu dans la prise en charge thérapeutique des tumeurs solides

L'existence des CSC a d'importantes conséquences thérapeutiques : en théorie, les CSC sont directement responsables du développement tumoral, elles sont liées à l'apparition des récidives ainsi que des métastases. Elles influencent aussi directement le pronostic clinique des patients. Ainsi une tumeur présentant un pourcentage important de CSC serait a priori de mauvais pronostic. On se rend compte toutefois que plus de 10 ans après les débuts des travaux sur les CSC, cette théorie n'a toujours pas été intégrée aux études cliniques et reste controversée.

Un des principaux enjeux de l'étude des CSC est de comprendre l'origine des récurrences tumorales après traitement. Ainsi les CSC, bien que possédant le même patrimoine génétique que les cellules non souches, semblent caractérisées par une résistance accrue aux traitements de chimiothérapie, radiothérapie ainsi qu'aux thérapies ciblées. La survie de cette fraction cellulaire occasionnerait alors une rechute, survenant après une première période de

rémission. Le ciblage des CSC en combinaison avec une thérapie globale serait alors une approche thérapeutique efficace (Figure 7), bien que compliquée à mettre en œuvre. En effet, les voies moléculaires spécifiques des CSC sont généralement aussi celles activées dans les cellules souches normales et les thérapies inhibant ces voies peuvent donc présenter une forte toxicité. Une seconde possibilité est le ciblage des marqueurs des CSC, la difficulté principale de cette approche étant de déterminer précisément ces marqueurs. Enfin, un troisième axe thérapeutique peut consister à induire la différenciation des CSC en cellules non souches, ce qui permettrait leur éradication grâce aux traitements couramment utilisés (Grotenhuis, Wijnhoven, and van Lanschot 2012; Y. Yu, Ramena, and Elble 2012). Dans le cadre des leucémies aiguës promyélocyitaires, cette dernière stratégie thérapeutique est utilisée depuis plus d'une décennie. En effet, l'acide tout-trans rétinoïque et notamment l'arsenic trioxide sont associés à une chimiothérapie conventionnelle, les anthracyclines, afin de rétablir la différenciation bloquée par une anomalie du récepteur à l'acide rétinoïque dans ce type de leucémie et a considérablement augmenté les taux de rémission (près de 80 %) (Grimwade et al. 2010).

Vermeulen et al., suggèrent que les essais cliniques tels qu'ils sont menés actuellement ne permettent pas d'observer les effets d'un agent thérapeutique sur les CSC (Vermeulen et al. 2012). En effet, le critère RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) utilisé pour évaluer l'efficacité d'un traitement en essai clinique de phase II tient compte principalement de la fonte tumorale. Or on peut imaginer que ces agents, ciblant uniquement une petite sous-population de CSC, n'auront pas une grande incidence sur la taille de la tumeur à court ou moyen terme, mais en revanche, qu'ils auront des effets bénéfiques à long terme en supprimant les cellules responsables de l'auto-renouvellement de cette tumeur. Les essais cliniques intégrant des thérapies dirigées contre les CSC devront donc tenir compte du mode d'action de ces agents thérapeutiques, et de nouveaux critères d'efficacité devront être établis. Ces critères pourront ainsi être basés sur la présence de marqueurs cellulaires de CSC dans les biopsies, éventuellement de biomarqueurs sécrétés par les CSC, sur la capacité clonogénique des cellules tumorales ou encore sur le phénotype des cellules tumorales circulantes.



**Figure 7. Intégration de la théorie des CSC dans le traitement des tumeurs solides.**

La survie des CSC aux traitements conventionnels, peut mener à des rechutes. L'intégration de la théorie des CSC dans la recherche de nouveaux traitements permettrait d'éliminer les facteurs nécessaires à la survie de cette sous-population. (Schéma adapté de Todaro et al. 2010)

## V- Classification TNM et les bases thérapeutiques

### V-1. Classification TNM

Les tumeurs sont classées selon la profondeur des tissus envahis, la diffusion régionale ou à distance au moment du diagnostique. La classification pTNM (pathology Tumor Node Metastasis) est le système international actuel de référence, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix, dans les années 1940-1950, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique. Dans son principe, cette classification est basée que sur des données histologiques et d'imageries, afin de faciliter la prise en charge des patients et ne s'applique donc qu'à des cancers qui n'ont pas encore été traités.

La lettre **T** symbolise la tumeur initiale et la profondeur des tissus envahis. Elle est affectée de coefficient : de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les

plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion, et de l'extension aux organes voisins (peau, vaisseaux, nerfs, os, etc.).

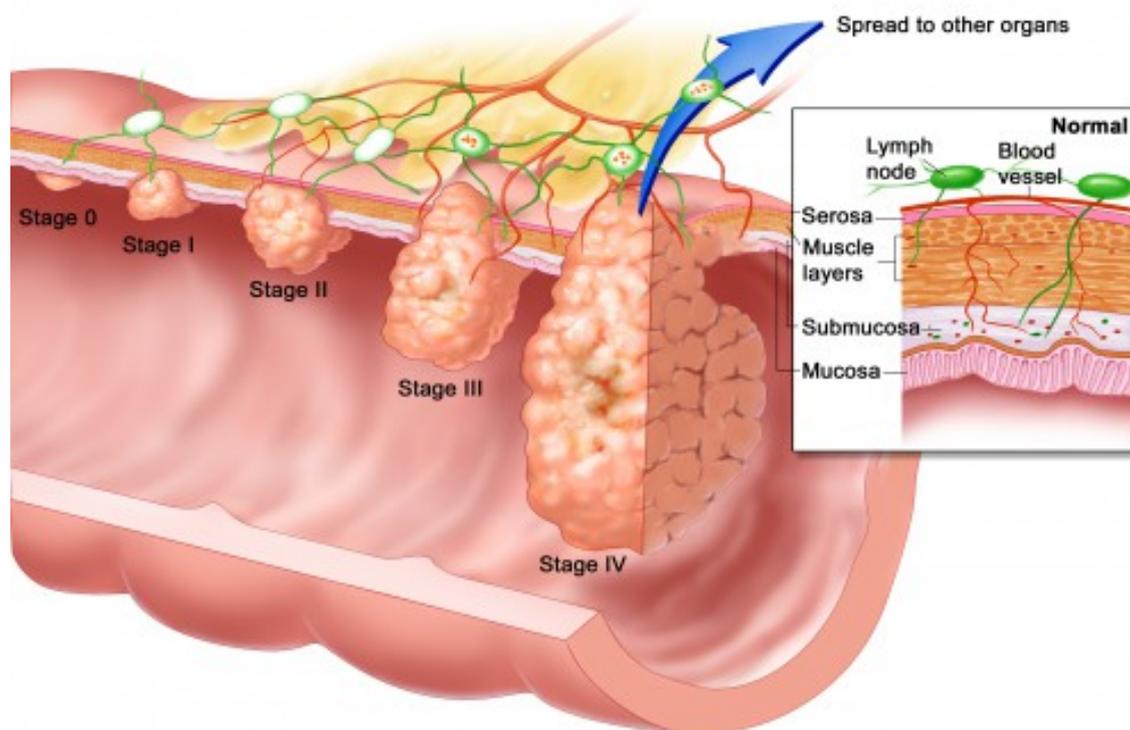
La lettre **N**, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, de l'importance des adénopathies, du nombre de ganglions envahis.

La lettre **M** est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

A partir de cette observation, les CCR ont été classés en cinq stades (Figure 8) :

- Stade 0 ou Tis (N0, M0)
- Stade I (T1-T2, N0, M0)
- Stade II (T3-T4, N0, M0)
- Stade III (Tous T, N1-N2, M0)
- Stade IV (métastases à distance)

Ce système de classification topographique était prépondérant quand les principaux traitements des cancers, la chirurgie et la radiothérapie, n'avaient que des effets localisés. Sa pertinence diminue avec les traitements systémiques tels que la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie, la thérapie génique, etc. L'intérêt croissant pour de nouveaux caractères biologiques (degré de malignité, récepteurs hormonaux, modifications des chromosomes ou d'oncogènes, signature génétique...) participant à l'élaboration de la stratégie thérapeutique réduit encore davantage la pertinence de ce classement.



**Figure 8. Illustration schématique des différents stades tumoraux.**

La classification pTNM (pathology Tumor Node Metastasis) permet de distinguer 5 stades tumoraux (0, I, II, III et IV). Au stade 0, le cancer ne touche que la première couche de la paroi interne (muqueuse) du côlon ou du rectum. Au stade I, la tumeur atteint la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculature. Au stade II, la tumeur a traversé la séreuse et perforé le péritoine viscéral, pouvant se propager aux tissus environnants. Au stade III, les cellules cancéreuses atteignent les ganglions lymphatiques péri-viscéraux régionaux. Le stade IV est le stade métastatique, la tumeur est vascularisée et une désorganisation totale de la paroi colique est observée. Le cancer s'est étendu à des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons. (Schéma adapté d'après l'Institut National du Cancer)

## V-2. Prises en charge thérapeutique des CCR

### a) Chirurgie

La chirurgie constitue le traitement de première intention du CCR. Les cancers très superficiels sont parfois totalement réséqués par voie endoscopique, sans chirurgie complémentaire si la muqueuse musculaire n'est pas franchie. Le seul traitement curatif actuel est l'exérèse chirurgicale de type R0 (Résidu 0), emportant la tumeur primitive, ses relais ganglionnaires et d'éventuelles métastases, ne laissant aucun reliquat macro ou microscopique, selon les critères qualité de la chirurgie carcinologique définie par l'Institut National du Cancer. Toutefois, malgré de réels progrès dans la prise en charge thérapeutique, le diagnostic reste encore trop tardif. En effet, dans plus de la moitié des cas le CCR est dépisté à un stade

métastatique. C'est pourquoi, dans bien des cas, des traitements systémiques à base de chimiothérapie sont combinés à la chirurgie. La chimiothérapie néo-adjuvante administrée avant la chirurgie afin de diminuer la masse tumorale et de contrôler la progression de la maladie, permet à 10% des cas des patients métastatiques, initialement « non résécables » de bénéficier d'une chirurgie optimale de type R0, les métastases ayant parfois complètement disparu au terme de plusieurs mois de chimiothérapie. Chez les patients à haut risque de récurrence, et si l'état général le permet, une chimiothérapie dite adjuvante est proposée en post-opératoire, diminuant ainsi le taux de récurrence. Plusieurs schémas thérapeutiques sont actuellement proposés. Ils sont choisis en fonction du stade initial de la maladie et des comorbidités.

## b) Chimiothérapie

La chimiothérapie est utilisée pour prévenir ou traiter les cancers métastatiques. Cette thérapie consiste à administrer au malade un médicament cytotoxique ciblant les cellules ayant une activité mitotique importante, comme les cellules tumorales, mais malheureusement aussi les cellules normales intestinales, hématopoïétiques et celles des follicules pileux.

Les chimiothérapies classiques regroupent un ensemble de médicaments que l'on peut classer en quatre catégories suivant leur mode d'action :

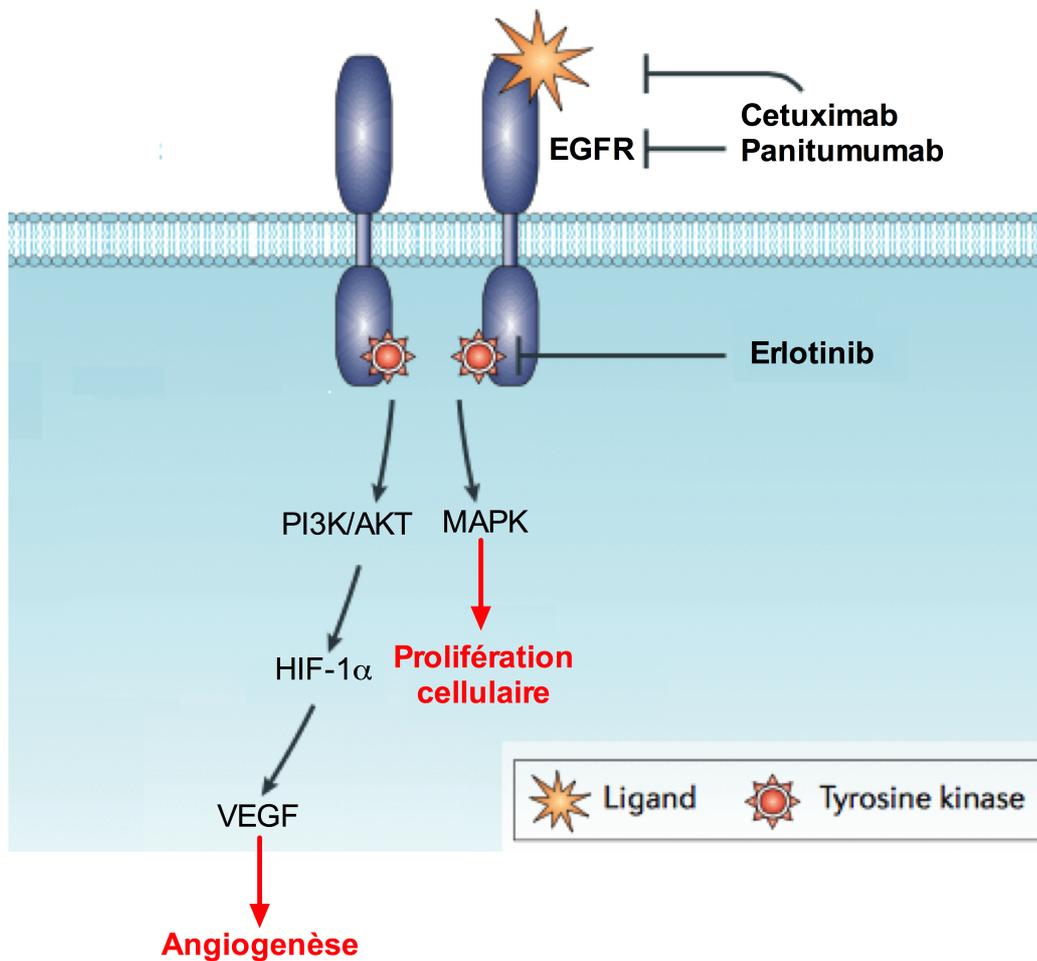
- les agents alkylants (ex : dérivés du platine, tel que l'oxaliplatine)
- les anti-métaboliques (ex : 5-Fluorouracile, Méthotrexate, Fludarabine)
- les poisons du fuseau mitotique (ex : vinca-alkaloides, taxanes (paclitaxel))
- les inhibiteurs des topoisomérases I (ex : camptothécines) et II (ex : anthracyclines)

La première molécule utilisée a été le 5-Fluorouracile (5-FU), un analogue de la pyrimidine jouant le rôle d'anti-métabolique. Elle est toujours la molécule de référence et entre dans la quasi-totalité des protocoles de chimiothérapie. L'oxaliplatine qui possède une action alkylante inhibant la synthèse et la réplication de l'ADN par formation de ponts intra-brins entre 2 guanines adjacentes et l'irinotecan qui est une pro-drogue dont le métabolite inhibe la topoisomérase I, ont un effet anti-tumoral synergique au 5-FU. Au stade métastatique, ils sont associés avec le 5-FU selon les protocoles FOLFOX et FOLFIRI (André et al. 1999; Goldberg et al. 2004; Tournigand et al. 2004) augmentant ainsi la médiane de survie des patients.

### c) Thérapies ciblées

Plus récemment devant l'échec relatif des traitements classiques de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été envisagées permettant la mise en place des « thérapies ciblées ». Il s'agit principalement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines des voies de signalisation couramment dérégulées et concourant à l'oncogénèse. Les deux principales cibles de ces thérapies sont le l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). La partie concernant les thérapies ciblant le VEGF sera détaillées dans la partie C.

L'EGFR, est actuellement une cible clé dans le CCR et est très souvent surexprimé. Son activation est fortement impliquée dans la progression tumorale, incluant la prolifération, la maturation, l'angiogenèse, la formation de métastases ainsi que l'inhibition de l'apoptose (Rocha-Lima et al. 2007). La surexpression d'EGFR est en corrélation avec un facteur de mauvais pronostic (Spano et al. 2005). Le **cetuximab** (Erbix<sup>®</sup>) est un anti-EGFR, un anticorps monoclonal jouant le rôle d'inhibiteur compétitif, empêchant la fixation du ligand sur le récepteur et donc son activation (Iqbal and Lenz 2004; S. Li et al. 2005). Il apporte un bénéfice en survie pour les patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRM) après échec des chimiothérapies usuelles (Jonker et al. 2007; Sobrero et al. 2008) et a apporté la preuve de son intérêt en première ligne, en association avec le 5-FU et l'oxaliplatine (Bokemeyer et al. 2011). Toutefois, il ne peut être administré que si le statut de KRAS est non muté, et l'importance de ses effets secondaires limite actuellement son emploi. L'association du cetuximab et d'une chimiothérapie a été évaluée en situation adjuvante (administration d'un traitement auxiliaire après résection chirurgicale d'une tumeur) dans le CCR. L'ajout du cetuximab n'améliorait pas la survie sans progression (SSP), pour les patients KRAS sauvage ou KRAS muté (Alberts et al. 2012). D'autres anticorps monoclonaux sont utilisés tels que le **panitumumab** (Vectibix<sup>®</sup>) (également indiqué dans le CCRM) (Krejsa, Rogge, and Sadee 2006; Okines, Cunningham, and Chau 2011). En parallèle, des anticorps monoclonaux, des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur ont été développés tel que l'**erlotinib** (Tarceva<sup>®</sup>) et sont indiqués dans d'autres cancers (Arteaga 2003; Winder and Lenz 2010). L'erlotinib inhibe la phosphorylation intracellulaire de l'EGFR en se liant spécifiquement au site ATP des tyrosine kinase. Ceci entraîne un blocage de la signalisation médiée en aval par l'EGFR. Les modes d'action de ces molécules sont schématisés dans la Figure 9.



**Figure 9. EGFR et molécules thérapeutiques dans le cadre du CCR.**

Le panitumumab et le cetuximab sont des anticorps monoclonaux compétitifs empêchant l'activation de l'EGFR et des voies de signalisation impliquées dans les processus tumoraux tels que l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. Ils provoquent tous deux l'internalisation du récepteur. L'erlotinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. (Schéma adapté de Krejsa, Rogge, and Sadee 2006)

L'existence et la mise en œuvre de ces nouvelles thérapies combinées aux traitements préexistants ont permis une amélioration considérable de la prise en charge des patients. Cependant, de nombreux mécanismes de résistance aux traitements ont été mis en évidence. Cette résistance pourrait avoir lieu *via* l'émergence de clones cellulaires ne répondant pas aux thérapies.

## B – Réseau vasculaire et angiogenèse tumorale

Le réseau vasculaire assure de multiples fonctions au sein de l'organisme. Il représente un système de communication entre les tissus et les organes distants permettant, de transporter le sang à travers les tissus afin de les approvisionner en oxygène et nutriments, l'élimination de leurs déchets, l'homéostasie et la défense de l'organisme. La limite de diffusion de l'oxygène dans les tissus implique que chaque cellule de l'organisme se trouve à une distance maximum de 100 à 200  $\mu\text{m}$  d'un capillaire sanguin (P. Carmeliet and Jain 2000). Cet approvisionnement est assuré par un réseau vasculaire extrêmement développé, dont les ramifications au sein de l'organisme représentent une surface d'échange entre le sang et les tissus de l'ordre de 6500  $\text{m}^2$  dont plus de 90 % concernent la microcirculation.

### I- La néo-vascularisation dans le processus de développement tumoral

#### I-1. Les vaisseaux sanguins

Le réseau vasculaire est formé de vaisseaux sanguins dont la morphologie diffère en fonction de leur nature. On peut distinguer dans ce système vasculaire le réseau artériel qui part du cœur vers les organes et le réseau veineux qui ramène le sang au cœur. La paroi des gros vaisseaux (artères et veines) est composée de 3 strates cellulaires différentes. La *tunica intima* comprenant une couche pavimenteuse de **cellules endothéliales**, en contact direct avec le sang, la membrane basale ainsi qu'une couche interne élastique. La présence de valves anti-retour dans les veines facilite la circulation sanguine en empêchant le retour sanguin. Entourant cette structure, la *tunica media* est un revêtement concentrique constitué de **cellules musculaires lisses** qui participe au contrôle du diamètre des vaisseaux et contribue à la régulation du tonus vasculaire. L'épaisseur de la couche de cellules musculaires lisses est plus importante dans les artères, ce qui permet un maintien dynamique des vaisseaux exposés à une forte pression sanguine. La dernière strate de cellules autour du vaisseau sanguin est la *tunica adventitia*, composée d'une couche de tissu conjonctif qui contient des fibroblastes et des fibres de collagène (Figure 10A).

La vascularisation de l'organisme est essentiellement assurée par un réseau complexe d'artérioles et de veinules, ramifications des artères et veines, qui acheminent le sang et les

nutriments à travers l'organisme. Les artérioles et les veinules sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses plus ou moins éparées, implantées dans la lame basale des cellules endothéliales. Cependant, les échanges sanguins avec les tissus environnants se passent au sein d'un réseau complexe de capillaires, qui font le lien entre artérioles et veinules, et représentent la part la plus importante des vaisseaux sanguins. Les capillaires sont essentiellement constitués d'une monocouche de cellules endothéliales. Lors de leur ramification, les cellules musculaires lisses des artérioles et veinules sont remplacés par les **péricytes**, qui ont la même origine ontogénique et partagent des caractéristiques phénotypiques communes avec les cellules musculaires lisses, mais diffèrent essentiellement par leur forme étoilée (Figure 10A).

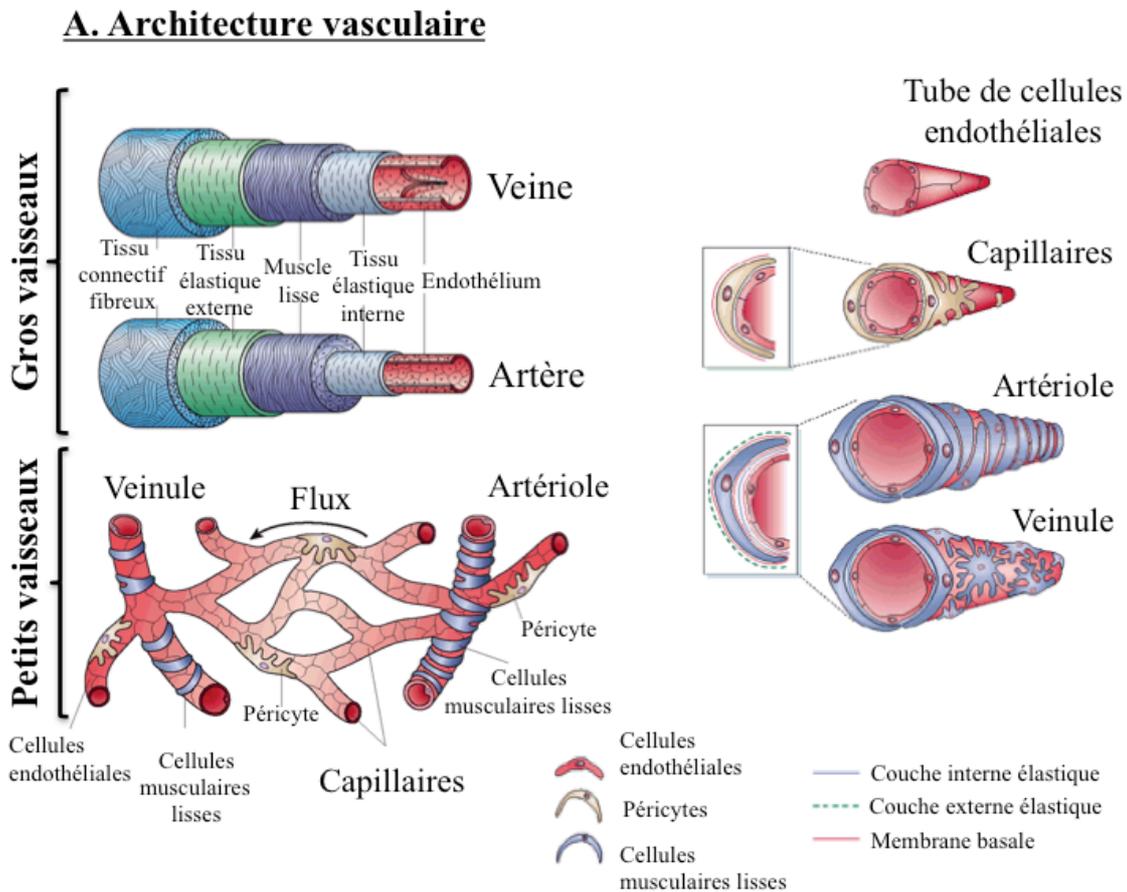
Les capillaires eux-mêmes présentent des différences morphologiques importantes. En effet, les besoins particuliers des divers tissus de l'organisme, en terme de qualité et quantité d'échanges, définissent un niveau de différenciation particulier en fonction des organes considérés (endothélium fenestré dans les glandes endocrines ou continu dans le cerveau) (Figure 10B).

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins par angiogenèse implique principalement les capillaires, très fins vaisseaux d'environ 5 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre.

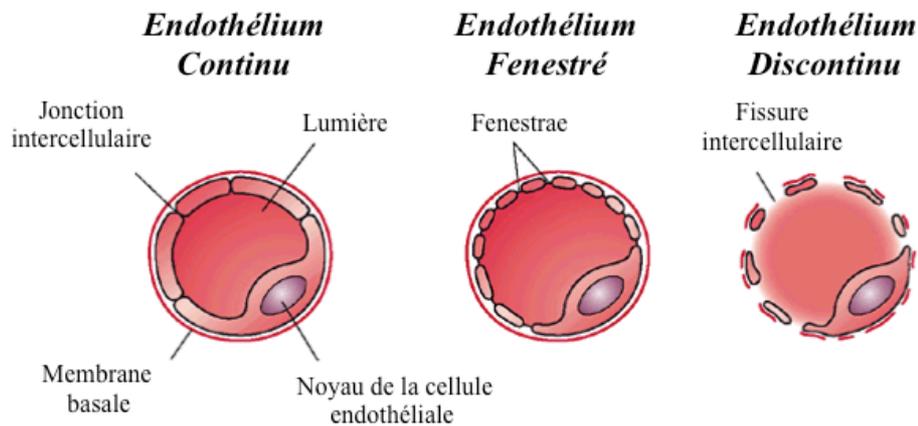
## I-2. Les différents processus de formation des néo-vaisseaux

La formation de vaisseaux sanguins se fait principalement selon deux mécanismes : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

La **vasculogenèse** correspond au processus par lequel des vaisseaux sanguins, constitués essentiellement de cellules endothéliales, sont formés par différenciation de précurseurs mésenchymateux. Les cellules endothéliales et hématopoïétiques dérivent d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. Les hémangioblastes s'agglutinent, et les cellules situées à l'intérieur de l'amas deviennent les cellules hématopoïétiques (qui se différencieront en globules rouges, globules blancs et plaquettes), tandis que les cellules en périphérie se différencient en angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales. La vasculogenèse contribue pour une grande part à la mise en place de l'appareil cardio-vasculaire et à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe, au cours du développement embryonnaire (Swift and Weinstein 2009).



## B. Différenciation de l'endothélium



**Figure 10. Réseau vasculaire**

A) Architecture vasculaire. La paroi des gros vaisseaux (artères et veines), est constituée de plusieurs tuniques disposées de la lumière des vaisseaux vers la périphérie qui sont : l'endothélium, le tissu élastique interne, le muscle lisse, le tissu élastique externe et le tissu connectif fibreux. Seul l'épaisseur des différentes strates diffère entre les artères et les veines. Les petits vaisseaux sont les artérioles, les veinules et les capillaires. Les artérioles et veinules sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules de muscles lisses plus ou moins éparses tandis que les capillaires sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales cependant les cellules de muscles lisses sont remplacées par des

péricytes. B) Différenciation de l'endothélium. Les capillaires présentent une morphologie différente selon les besoins des différents tissus de l'organisme. Ils peuvent être continu, fenestré ou discontinu. (Schéma adapté de Cleaver and Melton 2003; Jain 2003)

L'**angiogenèse**, quant à elle, est définie comme la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant (Carmeliet and Jain 2011). C'est un processus biologique complexe contrôlé par une panoplie de facteurs de croissance sécrétés dans leur environnement extracellulaire et agissant de façon paracrine sur les vaisseaux environnants. Elle intervient également dans les tissus en développement au cours de l'embryogenèse et joue ensuite un rôle fondamental chez l'enfant et l'adulte, dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta) (Reynolds and Redmer 2001), la réparation tissulaire (cicatrisation) ou encore l'ossification endochondrale (Bonnet and Walsh 2005). C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques. Pourtant, lors de certaines maladies, c'est principalement ce phénomène qui contribue à une néo-vascularisation pathologique (Carmeliet and Jain 2000), et entraîne la progression de maladies variées notamment inflammatoires (J. Folkman 1995), la maladie d'Alzheimer (Vagnucci and Li 2003) ou le cancer (Carmeliet 2003). Un processus voisin de celui de l'angiogenèse est la lymphangiogenèse, c'est-à-dire le remodelage vasculaire associé à la croissance de vaisseaux lymphatiques. La lymphangiogenèse ne fait cependant pas l'objet de ce travail de thèse et ne sera donc pas détaillé par la suite.

Contrairement à la vasculogenèse, l'angiogenèse se caractérise par la prolifération de cellules endothéliales différenciées à partir du réseau existant qui s'associent pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. On distingue deux types d'angiogenèses : l'angiogenèse par intussusception et l'angiogenèse par bourgeonnement.

Lors de l'angiogenèse par **intussusception**, les cellules endothéliales formant la lumière du vaisseau s'invaginent à l'intérieur de ce dernier puis établissent une cloison divisant la lumière préexistante. Ce phénomène contribue à la mise en place de l'arbre vasculaire dans certains organes au cours de l'embryogenèse ainsi qu'à la vascularisation tumorale (Patan, Munn, and Jain 1996; Djonov, Baum, and Burri 2003). Cependant, il est moins bien caractérisé que l'angiogenèse dite par bourgeonnement, qui représente le principal processus de néo-vascularisation chez l'adulte.

L'angiogenèse par **bourgeonnement**, est composée d'une étape de morphogenèse du néo-vaisseau suivi de la stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées. Dans un

premier temps, en réponse à un signal déclenchant, la matrice extracellulaire (MEC) est dégradée localement par la sécrétion de protéases spécifiques (activateur du plasminogène, collagénase et métallo-protéases). Les cellules endothéliales proches migrent ensuite vers l'espace péri-vasculaire où elles prolifèrent et s'associent pour former un néo-vaisseau. Il s'ensuit alors une étape dite de maturation du capillaire, assurée notamment par le recrutement de cellules péri-vasculaires tels que les péricytes et la synthèse de nouvelles protéines matricielles. Cette dernière étape de résolution du processus permet la stabilisation et le retour à la quiescence du vaisseau nouvellement formé.

A l'échelle tissulaire, les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques, quel que soit le stimulus physiologique ou pathologique initial ; seuls les mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent être légèrement différents.

### **I-3. L'angiogenèse tumorale**

Le processus physiologique de l'angiogenèse devient un événement essentiel à la croissance et à la dissémination tumorale, une fois dérégulé (Carmeliet and Jain 2000). L'observation que l'angiogenèse se produisait autour de tumeurs a été faite il y a plus de 100 ans (Goldmann 1908). Pourtant, la publication princeps en 1971 d'un jeune chirurgien, Judah Folkman, qui émettait l'hypothèse selon laquelle « *les tumeurs ont besoin de générer leur propre réseau vasculaire afin d'obtenir l'oxygène et les nutriments indispensables à la croissance* », suscita critiques et scepticisme de la part de la communauté scientifique (J. Folkman 1971). L'hypothèse de Folkman ne sera confirmée qu'en 1992 lorsque ce même chercheur montra que l'inhibition de l'angiogenèse pouvait être une stratégie anti-tumorale efficace (J. Folkman and Ingber 1992). Plus de 40 ans après, le bien-fondé de sa théorie qu'il défendait avec obstination, est maintenant clairement établi et a été à l'origine d'une intense recherche autour des mécanismes et molécules régulatrices de l'angiogenèse (Kerbel and Folkman 2002; Kerbel 2008).

La régulation de l'angiogenèse est un processus complexe, résultant de l'action de facteurs pro- et anti-angiogéniques, activant des voies de signalisation en partie connues et conduisant à l'activation ou à l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales des vaisseaux. Les cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sont maintenues dans un état de quiescence par la présence concomitante de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Cet équilibre

peut basculer en faveur de l'angiogenèse sous l'effet d'un excès de facteurs pro-angiogéniques ou un défaut de facteurs anti-angiogéniques par un mécanisme de commutation angiogénique ou « *switch angiogénique* » (Hanahan and Folkman 1996). Par ce mécanisme, une tumeur peut induire l'angiogenèse afin de disposer d'apports supplémentaires en oxygène et nutriments, indispensables à son développement. D'autres signaux capables d'initier ce « *switch* » incluent un stress métabolique, une baisse du pH, l'inflammation ou une réponse immunitaire, une chute de la glycémie ou l'activation d'oncogènes (Carmeliet and Jain 2000; Kerbel 2000; Kerbel 2008). La taille d'une tumeur non vascularisée est inférieure à 2 mm<sup>3</sup> et ses besoins en nutriments et en oxygène sont alors assurés par diffusion simple. On parle de **phase dormante** ou **avasculaire**. La perte de l'équilibre préexistant entraînant un excès de facteurs pro-angiogéniques par rapport aux agents anti-angiogéniques, va déclencher l'angiogenèse tumorale et de ce fait, permettre la croissance tumorale. Nous pouvons décomposer ce processus en plusieurs étapes (Figure 11).

### **Etape 1 : Initiation de l'angiogenèse**

L'induction d'expression du VEGF la plus importante est observée après stimulation par les facteurs de croissance ou les oncogènes, mais la condition la plus étudiée d'induction est l'hypoxie. L'hypoxie intra-tumorale induite par la forte prolifération des cellules cancéreuses, entraîne l'activation du facteur de transcription induit par l'hypoxie, HIF (*Hypoxia-Inducible Factors*) et en particulier la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . La stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  induit l'expression par les cellules tumorales et les cellules stromales de facteurs pro-angiogéniques, principalement le facteur de croissance endothélial vasculaire-A ; VEGF-A (Kerbel 2008).

En parallèle, se produit une activation des cellules endothéliales au cours de laquelle des facteurs pro-angiogéniques et en particulier les membres de la famille du VEGF se lient à leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales, le VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*). Cette activation va également induire la sécrétion des protéases permettant la dégradation de la membrane basale du vaisseau, et facilitant la migration des cellules endothéliales.

### **Etape 2 : Dégradation de la membrane basale**

Les péricytes se détachent et les jonctions entre cellules endothéliales sont altérées. Le plasminogène extravasé dans le milieu péri-vasculaire est transformé en plasmine sous

l'action des activateurs du plasminogène : l'urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). La plasmine active ensuite des métallo-protéinases (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*, notamment MMP-2 et MMP-9), endopeptidases zinc-dépendantes sécrétées par les cellules tumorales, stromales et endothéliales. Toutes ces enzymes vont permettre la dégradation de différents composés (laminine, fibrine, fibronectine, élastine, collagène) de la MEC soutenant les vaisseaux (Kalluri 2003). Cette dégradation locale de la MEC va permettre aux cellules endothéliales activées leur migration dans l'espace matriciel dégradé et leur prolifération.

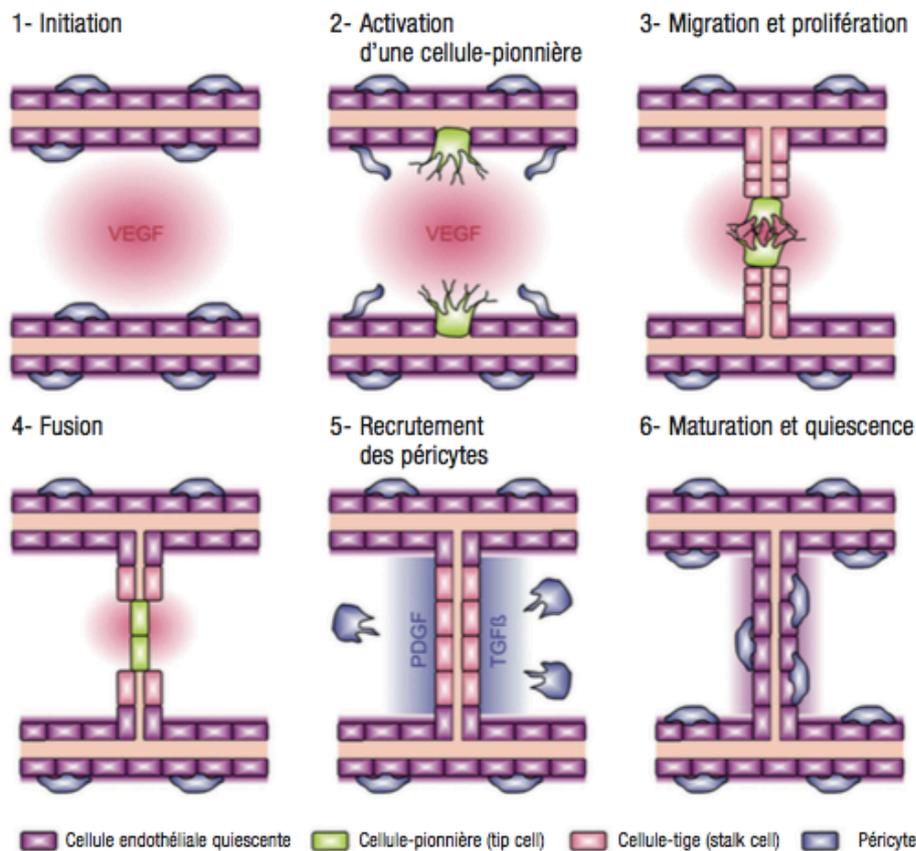
### **Etape 3 : Migration et prolifération des cellules endothéliales**

Libérées de la MEC, les cellules endothéliales vont migrer en direction de la source du stimulus angiogénique (la tumeur), par chimiotactisme. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape sont le FGFb (*basic Fibroblast Growth Factor*) et le VEGF (A. W. Griffioen and Molema 2000). Une hiérarchie s'établit au sein des cellules activées avec l'engagement d'une cellule vers un phénotype « tip-cell » émettant des filopodes et permettant de guider la formation de nouvelles ramifications dans la matrice dégradée. Elles sont suivies par des cellules d'un phénotype différent les « stalk-cell », restant alignées et jointives derrière la « tip-cell » et allongeant progressivement le bourgeon vasculaire par le biais de divisions mitotiques (toujours sous l'influence du VEGF et FGFb). Lorsque les deux bourgeons vasculaires se rencontrent, ils établissent une jonction qui conduit *in fine* à la formation d'une nouvelle anastomose micro-vasculaire, ce mécanisme est encore mal connu.

### **Etape 4 : Remodelage vasculaire**

Suite à cette prolifération, les cellules endothéliales se réorganisent en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Cette dernière étape a pour but de reconstituer une membrane basale autour des nouveaux capillaires et leur assurer une couverture péricytaire afin de les stabiliser. Par l'intermédiaire du PDGF-BB (*Platelet Derived Growth Factor-BB*), les cellules endothéliales vont recruter des progéniteurs mésenchymateux qui se différencieront en péricytes et favoriser leur accolement sur les néo-vaisseaux (Betsholtz 2004). Le TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) est lui stocké à la surface des cellules endothéliales et peut être activé par les cellules précurseurs des péricytes recrutés *via* le PDGF (Sato et al. 1990). Le TGF $\beta$  ainsi produit se lie sur le récepteur T $\beta$ RI

(ALK5) des progéniteurs mésenchymateux et stimule leur différenciation en péricytes. Finalement, le BMP-9 (*Bone Morphogenetic Protein-9*) en se liant à un complexe de récepteurs composé d'ALK1, BMPRII ou activine RIIA et endogline, entraîne un signal de quiescence vasculaire (David et al. 2008).



**Figure 11. Etapes de l'angiogenèse.**

1-Initiation : Sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (en particulier le VEGF) induite par l'hypoxie et dégradation de la membrane basale ; 2-Activation d'une cellule pionnière et détachement des péricytes ; 3-Prolifération des cellules endothéliales et migration des bourgeons vasculaires ; 4-Fusion des 2 bourgeons vasculaires ; 5-Recrutement et différenciation des péricytes par le PDGF et le TGF-β ; 6-Maturation et quiescence vasculaire. (<http://www.jle.com/fr/VEGF/VEGF.SOM.21/7-10.pdf>)

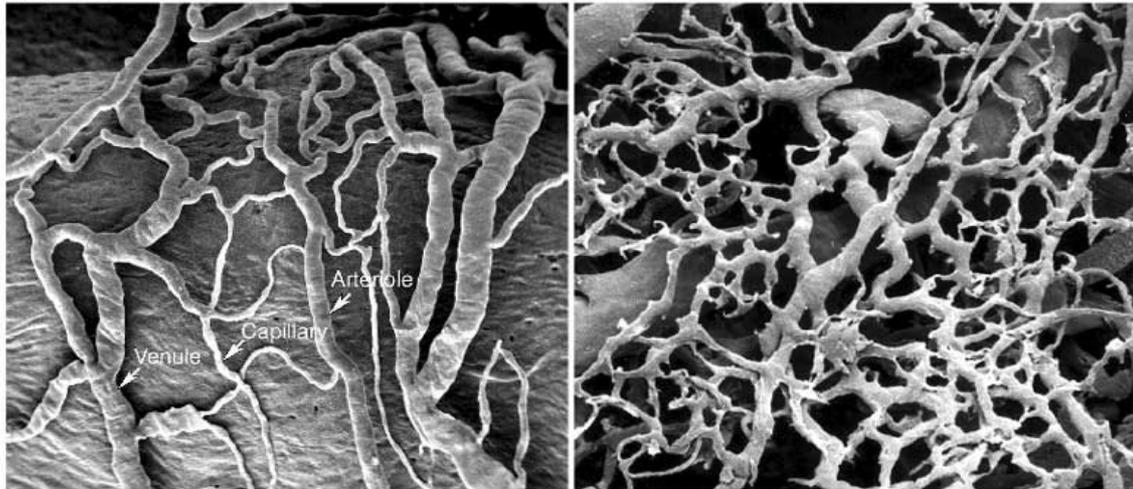
L'angiogenèse a longtemps été interprétée comme un processus exclusivement local, considérée comme le principal paradigme pour la néo-vascularisation tumorale. Cependant, depuis une dizaine d'années, de nouveaux éléments ont amené la révision de ce modèle. De multiples populations cellulaires recrutées à distance par ces facteurs pro-angiogéniques circulent dans le sang et sont capables de migrer au site tumoral où elles assurent des fonctions spécifiques dans la néo-angiogenèse (Rafii et al. 2002; Seandel et al. 2008). Parmi

celles-ci, les cellules endothéliales progénitrices (CEP) et les cellules endothéliales circulantes (CEC) ont été l'objet d'un intérêt particulier parce qu'ils étaient susceptibles de refléter directement un processus actif de néo-angiogenèse voire de jouer un rôle physique dans la formation des vaisseaux tumoraux (Bertolini et al. 2006; Shaked et al. 2006). Ces CEP et CEC peuvent en effet, s'incorporer dans les sites d'angiogenèse et contribuer à l'augmentation de la néo-vascularisation, avec probablement une différenciation *in situ* des CEP en des cellules endothéliales matures. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont différents des réseaux capillaires normaux (Figure 12). On retrouve des différences :

- **architecturales** : leur architecture est souvent anarchique et leurs arborisations sont irrégulières. Les réseaux vasculaires sont chaotiques, fragilisés, formés de vaisseaux de diamètre irrégulier, dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération ;
- **histologiques** : leurs parois sont bordées de cellules endothéliales parfois fenestrées, reposant sur une membrane basale souvent incomplète ou dissociée. La perméabilité vasculaire qui en résulte conduit à de fortes pressions interstitielles (McDonald and Baluk 2002). Les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales, ce qui explique la fragilité des vaisseaux tumoraux (Jain and Booth 2003).
- **hémodynamiques** : le flux est discontinu et entraîne l'apparition d'une hypertension interstitielle. Les réseaux capillaires associés aux tumeurs sont constamment dépourvus de sphincters pré-capillaires.

Ces conditions favorisent une aggravation persistante du phénotype anormal des vaisseaux tumoraux. Malgré la formation de ces néo-vaisseaux, on peut souvent observer une hypoxie et une nécrose intra-tumorales. De plus, cette perméabilité anormale et excessive, favorise le phénomène d'extravasation plasmatique et de ce fait, la formation de métastases à distance.

Enfin, l'ensemble de ces caractéristiques implique un défaut de perfusion de la tumeur qui limite la délivrance des molécules thérapeutiques (Carmeliet and Jain 2000). Cette néo-vascularisation favorise donc la progression tumorale et limite l'efficacité thérapeutique.



**Figure 12. Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux.**

A gauche ; *vasa vasorum* de sinus carotidien de rat. A droite ; xénogreffe de tumeur humaine chez une souris *nude*. Le réseau vasculaire normal présente un agencement clair en artérioles, capillaires et veinules. Au contraire, le réseau vasculaire tumoral est désorganisé ; artérioles, capillaires et veinules ne sont pas clairement identifiables. (McDonald and Choyke 2003)

#### **I-4. Les inducteurs et inhibiteurs naturels de l'angiogenèse**

Malgré l'abondance de facteurs pro-angiogéniques dans différents tissus, le taux de renouvellement des cellules endothéliales chez un adulte sain est relativement faible (de l'ordre de 1000 jours). Les cellules endothéliales sont maintenues dans un état de quiescence par la présence concomitante de facteurs anti-angiogéniques endogènes. De plus, inducteurs et inhibiteurs coexistent souvent dans les tissus présentant une angiogenèse conséquente. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'il existe un équilibre naturel entre facteurs pro- et anti-angiogéniques, et que le processus d'angiogenèse résulte d'un déséquilibre entre ces facteurs.

L'angiogenèse est dépendante de la production par les cellules tumorales de **facteurs pro-angiogéniques**. Les cellules du microenvironnement tumoral, favorisent également l'angiogenèse et le développement tumoral. Les cellules impliquées dans ce mécanisme sont les cellules immunitaires, les cellules musculaires et les cellules stromales. Ces inducteurs naturels de l'angiogenèse capables de stimuler la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales sont nombreux. Ils sont, pour la plupart, sécrétés par les cellules tumorales, mais peuvent aussi l'être par les cellules du stroma.

Ces facteurs pro-angiogéniques impliqués lors des différentes étapes de l'angiogenèse peuvent être regroupés suivant leur principal rôle physiologique, dont quelques-uns sont cités ci-dessous:

- Les facteurs de croissance : VEGF, PDGF, FGF, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ , EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin Growth Factor*), angiopoïétine-1;
- Les médiateurs de l'inflammation : TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), IL-8, IL-3 (*Interleukin*);
- Chimiokines : CXCL 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8
- Les facteurs hématopoïétiques : Erythropoïétine, G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) et GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*).

Les **facteurs anti-angiogéniques** agissent sur les cellules endothéliales en inhibant leur migration, leur prolifération et/ou leur capacité à former des capillaires fonctionnels. Des inhibiteurs naturels de l'angiogenèse ont été découverts dès les années 90 ; la thrombospondine (TSP-1), l'angiostatine et l'endostatine (Kalluri 2003). Durant ces dix dernières années, des dizaines d'autres molécules ont été identifiées (Folkman 2006; Ribatti 2009). L'angiostatine et l'endostatine inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et la croissance tumorale de carcinomes de poumon, de fibrosarcomes et de mélanomes *in vivo* (Boehm et al. 1997; Gorski et al. 1998; Mauceri et al. 1998; O'Reilly et al. 1997). La TSP-1 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et inhibe la néo-vascularisation *in vivo* (Streit et al. 2000). L'expression de ces inhibiteurs est détectée dans la circulation de souris et de personnes saines. Inhiber l'expression de ces facteurs favorise la croissance des tumeurs chez la souris et à l'inverse, si leur expression est augmentée, la croissance tumorale est bloquée (Nyberg, Xie, and Kalluri 2005; Ribatti 2009b). La cicatrisation est également altérée lorsque l'expression de ces protéines est modifiée (Seppinen et al. 2008). Parmi les chimiokines certains sont de puissants inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale, les CXCL 4, 9, 10, 11 et 14. L'activité des chimiokines dépend de leur liaison au récepteur CXCR3 (Strieter et al. 2005). Certaines isoformes du VEGF-A ont également une activité anti-angiogénique, cette partie est détaillée ci-après.

Ces résultats suggèrent que dans des conditions normales, ces inhibiteurs servent de régulateurs physiologiques modulant l'angiogenèse de façon transitoire, par exemple, lors de la réparation tissulaire et de la cicatrisation. Ils jouent également un rôle de barrière naturelle à l'induction ou la persistance de l'angiogenèse au cours du développement tumoral.

## II- Les acteurs de l'angiogenèse tumorale

### II-1. La grande famille du VEGF

La famille du VEGF est composée de plusieurs membres (VEGF-A, VEGF-B, PlGF, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et VEGF-F) dont le plus étudié est le VEGF-A, nommé habituellement VEGF. Ce sont des glycoprotéines homodimériques qui jouent un rôle critique dans la vasculogenèse, la lymphangiogenèse et l'angiogenèse au cours du développement embryonnaire (Holmes et al. 2007). Les membres de cette famille se retrouvent autour d'une structure commune, caractérisée par huit résidus cystéine espacés par un domaine VEGF homologue. Ils se distinguent par leurs propriétés biologiques et physiologiques, ainsi que leurs affinités aux récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. L'activité induite par le VEGF peut être amplifiée par l'activation de deux corécepteurs, les neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2). Les VEGF-E et VEGF-F étant des formes rares, ils ne seront pas détaillés ci-dessous.

#### a) Le PlGF

Le PlGF pour « Placental Growth Factor » ne se lie qu'au récepteur VEGFR-1 et aux neuropilines (Park et al. 1994). Son invalidation a permis de constater que le PlGF n'est pas indispensable au développement vasculaire chez l'embryon (Carmeliet et al. 2001), mais il est impliqué dans l'angiogenèse tumorale (Luttun et al. 2002). Le PlGF peut entrer en compétition avec le VEGF pour la liaison au VEGFR-1, ce qui permettrait au VEGF de se lier préférentiellement au VEGFR-2 (Christinger et al. 2004), considéré comme le principal récepteur à l'origine des effets pro-angiogéniques du VEGF. Dans certaines conditions il peut agir comme antagoniste naturel du VEGF (Eriksson et al. 2002). L'utilisation d'un Ac spécifique du PlGF réduit la croissance tumorale (Fischer et al. 2007).

#### b) Le VEGF-B

Le VEGF-B tout comme le PlGF ne peut se lier qu'au VEGFR-1. Il est très abondant dans le cœur, les muscles squelettiques et le pancréas (Olofsson et al. 1999). Son rôle *in vivo*, n'est pas encore bien déterminé. Il semble jouer un rôle dans la vascularisation du cœur et des muscles squelettiques, ainsi que dans le développement de la moelle, mais ne semble pas pour autant indispensable à l'angiogenèse chez l'individu adulte (Aase et al. 1999).

### c) Le VEGF-C et le VEGF-D

Le VEGF-C et le VEGF-D partagent 60 % d'homologie de par la présence d'extensions N- et C- terminales, absentes chez les autres membres de la famille du VEGF (Lohela et al. 2003). Tous deux sont synthétisés sous forme d'un précurseur non actif (pré-protéines) qui doit être clivé par protéolyses successives pour donner le *VEGF Homology Domain* (VHD), présentant une affinité optimale pour les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. Par le VEGFR-2, le VEGF-C et le VEGF-D jouent un rôle dans l'angiogenèse, et, par le VEGFR-3, ils jouent un rôle important dans la lymphangiogenèse. Le VEGF-C est nécessaire aux étapes initiales de développement lymphatique et la présence des deux allèles est essentielle à un développement lymphatique normal (Karkkainen et al. 2004). Le VEGF-D induit la formation de réseaux lymphatiques au sein des tumeurs et favorise leurs métastases (Stacker et al. 2001). Le VEGF-C et le VEGF-D se fixent également au corécepteur NRP-2 pour favoriser et moduler la lymphangiogenèse (Kärpänen et al. 2006).

### d) Le VEGF-A

Le VEGF-A ou simplement VEGF est l'isoforme majeur. Il joue un rôle central dans l'angiogenèse physiologique, non seulement au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte. En effet, si l'inactivation d'un seul allèle du VEGF induit une létalité embryonnaire chez la souris entre les jours embryonnaires 9,5 et 11 (E9,5 et E11) (P. Carmeliet et al. 1996; N. Ferrara et al. 1996), une sur-expression du VEGF de deux à trois fois chez des souris transgéniques conduit, quant à elle, à des anomalies sévères de développement cardiaque et à la mort à E12,5-E14 (Miquerol, Langille, and Nagy 2000). Ces résultats suggèrent qu'une régulation fine des niveaux d'expression de ce facteur de croissance est très importante au cours du développement.

Le VEGF est également le facteur clé de la régulation de l'angiogenèse tumorale (Ferrara, 2004). Une forte expression du VEGF a été mise en évidence dans de nombreuses tumeurs solides, dont les tumeurs digestives, et a pu être corrélée avec la densité microvasculaire et l'invasivité tumorale, à la diffusion métastatique et au pronostic de la maladie (Takahashi et al. 1995; Dvorak 2002; Lord et al. 2003). Il existe différentes isoformes de VEGF plus ou moins actives sur les cellules endothéliales et l'angiogenèse. Certaines possèdent une activité pro-angiogénique et d'autres une activité anti-angiogénique. Ceci est le résultat d'un épissage

alternatif de son gène qui génère plusieurs isoformes. Ces isoformes sont nommées de façon générique VEGF<sub>xxx</sub> (xxx représentant le nombre d'acides aminés de la protéine mature) et incluent : les VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Les formes majoritaires étant les VEGF<sub>121</sub> (forme la plus diffusible), VEGF<sub>165</sub> (forme la plus pro-angiogénique) et VEGF<sub>189</sub>. En 2002, une nouvelle famille d'isoformes du VEGF a été identifiée. Ces variants ont été dénommés VEGF<sub>xxx</sub>b (Bates et al. 2002; Ladomery, Harper, and Bates 2007). Sur le plan structural, les isoformes VEGF<sub>xxx</sub> et VEGF<sub>xxx</sub>b ont la même taille, mais possèdent six acides aminés différents sur leur extrémité C-terminale. Sur le plan biologique, ces formes de VEGF<sub>xxx</sub>b possèdent une activité anti-angiogénique par rapport à leurs homologues VEGF<sub>xxx</sub>. En effet, les formes VEGF<sub>xxx</sub>b vont jouer le rôle d'inhibiteurs compétitifs en se liant sur le récepteur, empêchant ainsi la fixation du VEGF<sub>xxx</sub>. Cette fixation empêche donc l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur et n'entraîne pas les effets physiologiques du VEGF.

#### e) Les récepteurs au VEGF

Il existe plusieurs récepteurs de la famille du VEGF. Les principaux récepteurs, et les premiers identifiés sont les récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires possédant une **région extracellulaire** impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand, et un **domaine intracytoplasmique** possédant l'activité TK, reliés entre eux par une **région transmembranaire**. Suite à la **fixation du ligand**, le récepteur est **dimérisé**. La protéine kinase de chaque monomère du récepteur, phosphoryle des résidus tyrosine (Y) de l'autre monomère du récepteur (auto-/trans-phosphorylation), au niveau de la portion intracytoplasmique, ce qui résulte en une activation du récepteur et en une cascade de transduction du signal.

Il existe trois récepteurs de la famille du VEGF à activité TK, appartenant à la superfamille du récepteur au PDGF : **VEGFR-1** (*Fms-like tyrosine kinase-1*, Flt-1), **VEGFR-2** (*Fetal liver kinase-1*, Flk-1 pour sa version murine ou *Kinase insert Domain-containing Receptor*, KDR, pour son homologue humain), et **VEGFR-3** (*Fms-like tyrosine kinase-4*, Flt-4). Chaque sous-type de la famille du VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F et PlGF) peut se lier à l'un ou plusieurs de ces récepteurs, ce qui résulte en diverses fonctions biologiques.

- Le VEGFR-1

Le VEGFR-1, également appelé FLT-1 a été le premier récepteur découvert pour le VEGF. Il existe à la fois sous forme soluble et sous forme transmembranaire. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi par des cellules non endothéliales, comme les macrophages, les monocytes et les cellules de divers types tumoraux. Son rôle n'est pas très clair. L'inactivation de VEGFR-1 réalisée chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce. L'analyse des embryons révèle que le VEGFR-1 est important pour l'organisation du réseau vasculaire au cours du développement embryonnaire, alors qu'il ne semble pas intervenir dans la différenciation des cellules endothéliales (Fong et al. 1995). De façon paradoxale, le VEGF se lie au VEGFR-1 avec une affinité au moins dix fois supérieure au VEGFR-2 mais possède de faibles propriétés de transduction du signal (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). Il pourrait donc piéger le VEGF en excès afin d'empêcher sa fixation sur le VEGFR-2. Chez l'adulte, il active l'angiogenèse et la réponse inflammatoire. Il maintient la survie des cellules endothéliales en quiescence ou en prolifération (Peters, De Vries, and Williams 1993). Il régule également la migration des monocytes et des macrophages (Barleon et al. 1996). Bien que sa contribution à l'angiogenèse ne soit pas parfaitement éclaircie, il a été montré que ce récepteur coopère directement avec le VEGFR-2 par une hétérodimérisation (Kerbel 2008).

- Le VEGFR-2

Le VEGFR-2 ou KDR peut lier tous les isoformes du VEGF (à l'exception du VEGF-B) et joue un rôle central dans la stimulation de l'angiogenèse. Il est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales matures et des cellules endothéliales progénitrices (CEP) circulantes (précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse) (Kato et al. 1995). Le VEGFR-2 est considéré comme le médiateur principal des effets mitogènes et angiogéniques du VEGF. Son importance est illustrée par l'inactivation de son gène chez la souris, qui conduit à une létalité embryonnaire précoce, associée à un défaut de vasculogenèse, et une incapacité tant à développer des îlots sanguins qu'à organiser un réseau vasculaire (Shalaby et al. 1995). Les effets de la liaison du VEGF au VEGFR-2 sont nombreux et incluent notamment l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la prolifération, la survie des cellules endothéliales et la migration (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). Schématiquement, la prolifération des cellules endothéliales passe par l'activation de la voie ERKs (*Extracellular-signal-Regulated proteins Kinases*) suite à l'activation de la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ),

alors que la survie et la migration cellulaire impliquent respectivement la voie de la PI3 kinase et de FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Le VEGFR-2 peut s'hétérodimériser avec le VEGFR-1 ou le VEGFR-3 (Olsson et al. 2006) (Figure 13).

- Le VEGFR-3

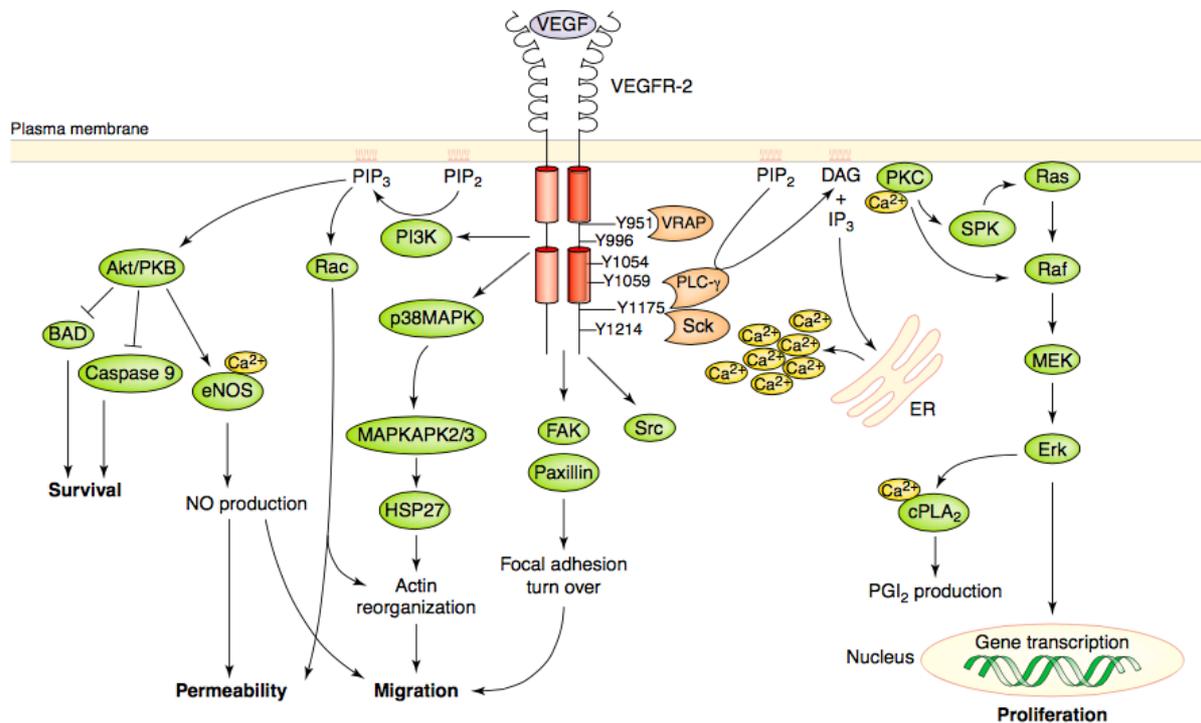
Le VEGFR-3 est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D ; c'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. Chez l'embryon, le VEGFR-3 est initialement présent sur tous les vaisseaux (sanguins et lymphatiques), mais cette expression va ensuite se limiter aux vaisseaux lymphatiques (Kaipainen et al. 1995). L'inactivation du gène codant pour le VEGFR-3 est létale par malformation du réseau vasculaire primaire et insuffisance cardiaque avant que le système lymphatique ne soit développé, ce qui suggère un rôle important du VEGFR-3 dans le développement cardio-vasculaire chez l'embryon (Dumont et al. 1998). Chez l'adulte, le VEGFR-3 est principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGF-C peut induire la formation d'hétérodimères VEGFR-2/VEGFR-3 sur les cellules endothéliales lymphatiques (Dixelius et al. 2003).

D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont plus récemment été identifiés. Il s'agit des neuropilines (NRP), qui sont considérées comme jouant un rôle de corécepteurs des isoformes du VEGF liant l'héparine.

- Les neuropilines

Les NRPs sont des récepteurs non à activité TK composées de 5 domaines : une portion extracellulaire composée de 3 domaines, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Il existe deux formes de NRPs ; la NRP-1 et NRP-2. La liaison du ligand à NRP-1 et NRP-2 est hautement spécifique : NRP-1 peut se lier au VEGF<sub>165</sub> (un isoforme du VEGF-A), VEGF-B et PlGF-2 (un isoforme du PlGF) alors que NRP-2 lie le VEGF<sub>165</sub>, VEGF-C et PlGF. Ils ont été détectés dans de nombreux types cellulaires dont sur les cellules endothéliales (Soker et al. 1997) et également au niveau de l'endothélium vasculaire des tumeurs (Stephenson et al. 2002; Broholm and Laursen 2004). La NRP-1 et la NRP-2 sont aussi exprimées au niveau de plusieurs types de cellules tumorales. Par exemple, dans les cancers du poumon non à petites cellules, l'expression de la NRP-1 et de la NRP-2 est supérieure à celle trouvée dans les tissus non néoplasiques (Kawakami et al. 2002). Au stade embryonnaire ils interviennent dans le développement du système cardio-vasculaire et

système nerveux et chez l'adulte, notamment en conditions pathologiques ils ont un rôle dans l'angiogenèse tumorale et le processus métastatique.



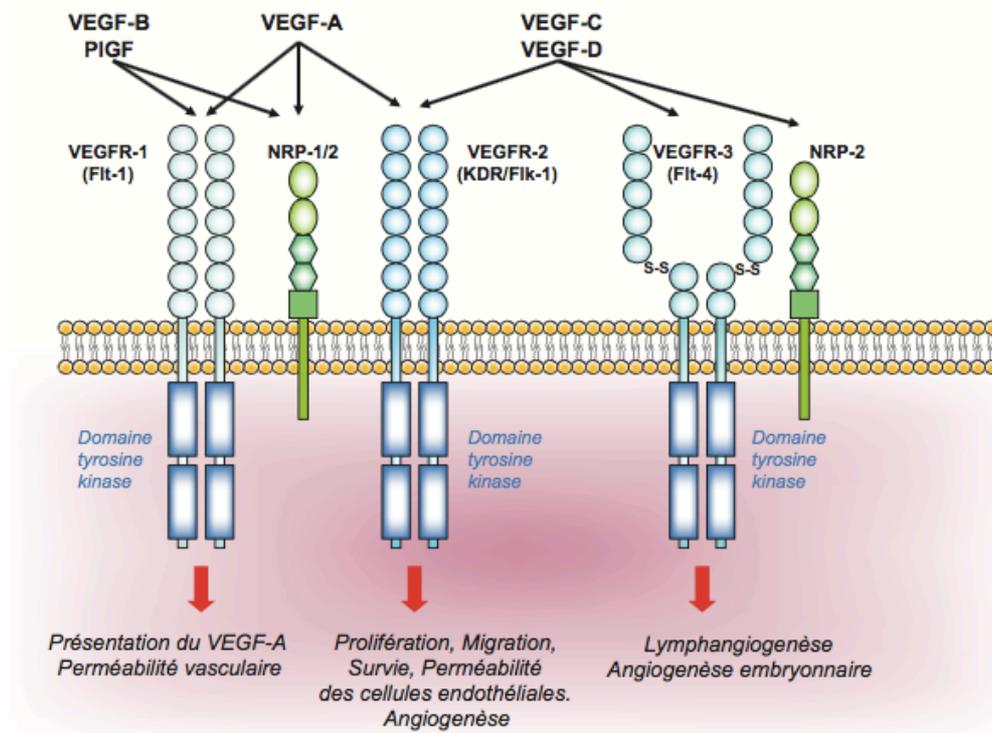
**Figure 13. Signalisation intracellulaire médiée par le VEGFR-2.**

Suite à la liaison du ligand au niveau de son domaine extracellulaire, le récepteur est dimérisé, et des résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés. Les différentes voies de transduction du signal conduisent à divers effets: perméabilité vasculaire, survie, migration et prolifération des cellules endothéliales. (Cross et al. 2003)

Lors du développement, NRP-1 est préférentiellement exprimé au niveau artériel et NRP-2 aux niveaux veineux et lymphatique. Une absence d'expression de la NRP-1 dans des souris transgéniques est létale au stade embryonnaire et s'accompagne d'anomalies neuronales et vasculaires (Kawasaki et al. 1999). En revanche, les souris mutées de façon homozygote pour NRP-2 sont viables mais présentent des capillaires et vaisseaux lymphatiques réduits en nombre et en taille : ainsi, NRP-2 a principalement un rôle dans l'angiogenèse en tant que co-facteur du VEGFR-3 (Yuan et al. 2002). Par ailleurs, dans des tumeurs humaines, l'expression de la NRP-1 est corrélée avec la croissance tumorale et le pouvoir invasif du cancer de la prostate (Latil et al. 2000), colorectal (Parikh et al. 2004; Hansel et al. 2004), du poumon (Lantuéjoul et al. 2003), du sein (Stephenson et al. 2002) et des astrocytomes (Broholm and Laursen 2004; Ding et al. 2000). Dans le cancer de la vessie, l'expression de la NRP-2 est corrélée avec l'avancement du cancer (Sanchez-Carbayo et al. 2003).

Le dogme selon lequel les NRPs ne pourraient pas seules transmettre de signaux intracellulaires tend à être remis en cause. En effet, l'expression des NRPs a été observée dans plusieurs types de cancer, notamment du pancréas (M. Li et al. 2004), du sein (Bachelder et al. 2001; Barr et al. 2005) et le neuroblastome (Beierle et al. 2004), en l'absence des VEGFR.

La liaison des différents isoformes du VEGF sur leurs récepteurs est schématisée sur la figure 14.



**Figure 14. Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs.**

Ce schéma illustre la liaison des différents isoformes de VEGF sur les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 et sur les corécepteurs NRP-1 et NRP-2. La liaison du VEGF à son récepteur stimule la dimérisation et l'autophosphorylation de celui-ci et ainsi induit l'activation de plusieurs voies de signalisation. (<http://www.jle.com/fr/VEGF/VEGF.SOM.21/7-10.pdf>)

## II-2. Le VEGF et l'angiogenèse tumorale

### 1) Le rôle du VEGF et de ses récepteurs

Un grand nombre de cellules cancéreuses humaines expriment le VEGF à des niveaux élevés (Kerbel and Folkman 2002). Une surexpression tumorale du VEGF est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans un grand nombre de cancers (Kondo et al. 1994; Pathak et

al. 2008; Salgia 2011) qui est très souvent augmenté chez les patients. Si le VEGF a un rôle prépondérant dans le switch angiogénique, celui-ci peut également avoir un effet stimulateur sur les cellules tumorales elles-mêmes. Plusieurs travaux ont rapporté que l'existence de récepteurs au VEGF et des corécepteurs NRP-1 et NRP-2 n'est pas restreinte aux cellules endothéliales mais qu'ils étaient présents également sur les cellules tumorales. Les cellules tumorales expriment ces récepteurs qui sont fortement impliqués dans le développement de la tumeur (Fan et al. 2005; L. M. Ellis 2006; S. Lee et al. 2007; T.-H. Lee et al. 2007). Comme les cellules tumorales expriment à la fois les récepteurs et le ligand, il semblerait que le VEGF puisse agir comme facteur de croissance autocrine sur les cellules tumorales. La fixation sur son récepteur entraîne la dimérisation, l'autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie, la perméabilité et la migration des cellules endothéliales. L'activation du récepteur est amplifiée par la présence à la surface des cellules des NRPs. Ces corécepteurs ont également montré une possibilité de signalisation propre dans les cellules cancéreuses. Les NRPs sont ainsi d'autres protéines intéressantes dans le ciblage de l'angiogenèse et les expériences réalisées chez l'animal avec des anticorps anti-NRP-1 ou anti-NRP-2 ont apporté des résultats prometteurs (Zeng et al. 2014; Gray et al. 2008).

## 2) La régulation de l'expression du VEGF

Dans les conditions physiologiques, l'expression du VEGF est extrêmement contrôlée. Cependant, deux grands mécanismes peuvent entraîner la surexpression du VEGF :

- des **modifications génétiques**, notamment suite à l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs,
- des **modifications épigénétiques**, secondaires à des facteurs environnementaux (hypoxie, pH bas, cytokines de l'inflammation), facteurs de croissance, aux hormones sexuelles (androgènes et oestrogènes) ou à des chimiokines (Hicklin and Ellis 2005).

La condition physio/pathologique la plus étudiée d'induction de VEGF est l'hypoxie (Shweiki et al. 1992). Elle régule la transcription, la stabilité et la traduction de l'ARNm du VEGF (Dor et al., 2001). Le VEGF possède dans son promoteur un élément de réponse à l'hypoxie, élément HRE pour «*Hypoxia Response Element*» (Forsythe et al. 1996). Cette séquence permet l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie, par la fixation du

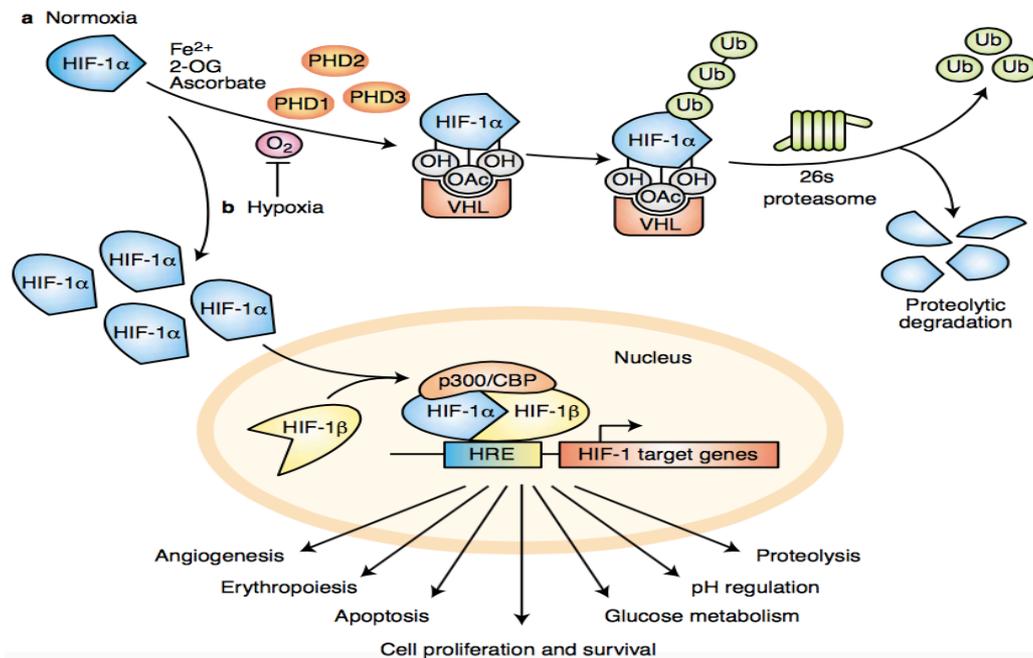
facteur de transcription HIF-1.

HIF-1 est un complexe hétérodimérique composé d'une sous-unité HIF-1 $\alpha$ , dont l'expression est stabilisée partiellement par la pression partielle en oxygène, et d'une sous-unité HIF-1 $\beta$  exprimée de façon constitutive (Gregg L. Semenza 2003). En **condition normoxique**, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée sur des résidus proline par une prolylhydroxylase (PHD, *prolyl hydroxylase domain*). Les prolines hydroxylées sont reconnues par la protéine VHL (*von Hippel-Lindau*) qui possède une activité ubiquitine ligase E3, qui permet au HIF-1 $\alpha$  d'être conduit vers le protéasome, entraînant sa dégradation. La demi-vie de HIF-1 $\alpha$  est dans ce cas très courte. En **condition d'hypoxie**, la diminution de l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  protège cette sous-unité de la dégradation protéasomale, aboutissant à la stabilisation et la translocation de la protéine dans le noyau, où elle se fixe à la sous unité HIF-1 $\beta$ . Le complexe formé se fixe alors sur la séquence nucléotidique HRE *via* la fixation de l'activateur de transcription CBP (*CREB-Binding Protein*). Ainsi, HIF-1 active la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie (ainsi qu'une série de plus de 50 gènes codant pour des facteurs protéiques impliqués dans la néo-angiogenèse, le métabolisme du glucose, les modifications de la MEC et la survie cellulaire) (Figure 15).

Une mutation de type « perte de fonction » au niveau du gène VHL provoque la maladie de von Hippel-Lindau. Il s'agit d'un syndrome caractérisé par l'apparition de multiples tumeurs bénignes ou malignes fortement vascularisées (Richard et al. 2004).

### 3) Conséquences de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale

Tous les tissus de l'organisme présentent physiologiquement une hétérogénéité quant à leur pression partielle en oxygène, mais l'hypoxie tissulaire est une marque quasi constante du microenvironnement d'une tumeur. Les cellules doivent être à moins de 1 ou 2 millimètres de la circulation sanguine afin d'être approvisionnées par simple diffusion en oxygène et en nutriments et maintenir leur survie (J. Folkman 1990). Cependant, les vaisseaux sanguins issus de la néo-vascularisation tumorale présentent une organisation spatiale très hétérogène, avec des vaisseaux dilatés tortueux, des shunts artérioloveineux, de grandes distances inter-capillaires. La structure des vaisseaux eux-mêmes est anormale avec un flux sanguin chaotique et des résistances hémodynamiques augmentées. Par conséquent, la perfusion des cellules tumorales éloignées des capillaires est plus limitée que pour des cellules normales.



**Figure 15. La signalisation de l'hypoxie.**

En présence d'oxygène (a), le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé dans le cytoplasme sur deux résidus proline ; cela permet sa reconnaissance par la protéine VHL, qui fait partie d'un complexe E3 qui le dirige vers le protéasome pour sa dégradation.

En absence d'oxygène (b), ces hydroxylations ne peuvent avoir lieu ; HIF-1 $\alpha$  est stabilisé et peut migrer dans le noyau, reconnaître son partenaire HIF-1 $\beta$  et initier la transcription *via* la fixation de l'activateur de transcription CBP. (Carroll and Ashcroft 2005)

L'environnement pauvre en nutriments carbonés et en oxygène exerce une pression sur les cellules cancéreuses aboutissant à la sélection d'une sous-population cellulaire capable non seulement de survivre sans métabolisme oxydatif (cycle de Krebs) mais aussi de proliférer malgré les conditions physiopathologiques hostiles. Les facteurs de transcription HIFs jouent un rôle central dans l'adaptation des cellules à la baisse de la quantité d'oxygène. De manière générale, les facteurs HIF-1 sont fortement impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire en réponse à un stress hypoxique alors que les facteurs de transcription HIF-2 régulent l'expression du gène de l'érythropoïétine et de gènes prolifératifs. Ainsi, le facteur de transcription HIF-2 jouerait un rôle plus important dans la tumorigenèse et l'angiogenèse tumorale que le facteur HIF-1 (Covello, Simon, and Keith 2005). Cependant, la détection de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les tumeurs a été corrélée à une diminution de la survie et à une moindre chimiosensibilité dans de nombreuses localisations tumorales. En effet, dans le cancer du sein, une expression élevée de HIF-1 $\alpha$  est associée à un mauvais pronostic vital des

patients. La survie sans progression (SSP) et la survie globale (SG) sont diminuées (Trastour et al. 2007). De plus, il jouerait également un rôle important dans la résistance à l'inhibition du VEGF (Kim et al. 2013). Le rôle central de HIF dans la progression tumorale et la résistance aux traitements anti-cancéreux en a fait une cible thérapeutique potentielle intéressante (Gregg L. Semenza 2003, 2010; Poon, Harris, and Ashcroft 2009; Monti and Gariboldi 2011). Plusieurs composés ciblant l'activité de HIF-1 sont actuellement testés en clinique.

### **II-3. Rôle des MMPs dans l'angiogenèse tumorale**

Les MMPs de la MEC forment une famille de 24 endopeptidases qui présentent des homologies de structure. L'une de leurs principales caractéristiques est d'être constituées d'une séquence polypeptidique comprenant un résidu cystéine qui contient un atome de Zinc (Zn) d'où leur nom générique de métallo-protéinases. Sous forme activée, elles peuvent dégrader la plupart des composants de la MEC. Les MMPs jouent un rôle fondamental au cours de l'embryogenèse, du remodelage des tissus normaux, des mécanismes de cicatrisation, de l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la formation des métastases. La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs est un événement précoce requis pour induire l'angiogenèse tumorale (cf. Etape 2 de Partie B.I-3 l'angiogenèse tumorale). Au cours de la dégradation de la MEC, le rôle combiné de l'activation du système de transformation du plasminogène en plasmine est essentiel car la plasmine est une protéase à large spectre qui coopère directement et indirectement avec les MMPs pour hydrolyser la fibrine. Le système d'activation de la plasmine est principalement composé de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA). Ces composés sont trouvés en grande quantité sous l'action des MMPs, lors des remodelages de la MEC. Dans les tumeurs, il a été montré que les MMP-2, MMP-7 et MMP-9 jouent un rôle promoteur de l'angiogenèse. L'inactivation de MMP-9 entraîne un retard de la vascularisation et une diminution de la densité des microvaisseaux (Vu et al. 1998; S. Huang et al. 2002). Une inactivation de MMP-2 a comme effet de réduire l'angiogenèse et la progression tumorale sur un modèle murin (Itoh et al. 1998). De plus, une étude a montré que MMP-2 et MMP-9 sont capables de coopérer afin de promouvoir le phénotype angiogénique (Masson et al. 2005). MMP-7 est capable de stimuler l'angiogenèse et la prolifération tumorale (Liu et al. 2007). Il a été également montré que des patients atteints de CCR présentent une accélération de l'angiogenèse et de la progression tumorale à la suite d'une augmentation des taux de MMPs,

MMP-7 inclus (Pengjun et al. 2013). Une récente méta-analyse indique par ailleurs que MMP-7 peut-être en corrélation avec le développement du CCR. Les auteurs proposent de ce fait MMP-7 comme biomarqueur pour les patients atteints de CCR (Xing, Gu, and Ma 2014).

D'autre part, la MEC est un réservoir de VEGF. Le VEGF est libéré lors de la dégradation de la MEC ou par un clivage du VEGF lui même pour donner des formes solubles. Les acteurs de cette libération sont les héparinases, la plasmine ainsi que les MMPs. Les enzymes qui dégradent la MEC sont essentielles au développement tumoral et parmi celles-ci l'expression des MMPs est augmentée dans différentes lignées de cellules tumorales. Ainsi, elles représentent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des cancers. Cependant, les MMPs ont un rôle très complexe dans le cancer. Elles ne possèdent pas uniquement une activité pro-angiogénique, elles sont aussi capable de supprimer la néo-vascularisation en activant et libérant des inhibiteurs de l'angiogenèse (Hamano et al. 2003). L'utilisation d'inhibiteurs de l'ensemble des MMPs n'a pour l'instant montré aucun bénéfice dans le traitement des cancers chez l'homme suggérant la nécessité d'approfondir les connaissances du rôle des MMPs dans l'angiogenèse tumorale en fonction du type de tumeur.

En conclusion, l'angiogenèse tumorale est une étape cruciale pour l'évolution de la maladie. Dans les conditions physiologiques, les cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sont maintenues dans un état de quiescence par la présence équilibré et concomitante de facteurs pro- et anti-angiogéniques. En revanche, au fur et à mesure de la croissance tumorale, un état hypoxique intra-tumoral est généré qui induit l'activation de facteurs de transcription inductibles de l'hypoxie HIF, et en particulier HIF-1 $\alpha$ . L'hypoxie induit l'expression par les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral des facteurs pro-angiogéniques, principalement le VEGF-A, qui enclenche le « *switch angiogénique* ». Via ce « *switch* », la tumeur acquiert la capacité d'induire le bourgeonnement et la croissance de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants. Du fait de la forte dépendance des tumeurs vis-à-vis de l'angiogenèse, les vaisseaux tumoraux sont rapidement apparus comme une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des cancers.

## C- Traitements et mécanismes de résistances aux anti-angiogéniques

La découverte du rôle de l'angiogenèse dans le développement tumoral et la reconnaissance du VEGF comme un facteur clé dans ce processus d'angiogenèse ont conduit, ces dernières années, au développement de molécules anti-angiogéniques (AAG) dans le traitement du cancer. Ces stratégies ont été développées pour inhiber la néo-vascularisation et/ou détruire des vaisseaux tumoraux existants directement par l'inhibition des cellules endothéliales ou indirectement par l'inhibition des molécules pro-angiogéniques produits par la tumeur. Les deux principales catégories (actuellement les plus développées) correspondent à deux types d'approche pharmacologique différents : les **anticorps monoclonaux**, correspondant sur le plan terminologique aux -mab et les **inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)** correspondant aux -inib. D'autres AAG, dont le mécanisme d'action ne passe pas par une inhibition de la voie du VEGF/VEGFR, existent ou sont en développement.

### I- Les traitements anti-angiogéniques (inhibiteurs de la voie VEGF/VEGFR)

#### I-1. Les anticorps monoclonaux

Le **bevacizumab** (Avastin<sup>®</sup>), un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF, est le premier traitement AAG à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM), en 2004 par la FDA (Food Drug Administration). Il inhibe donc la liaison du VEGF à son récepteur et bloque l'activation des voies de signalisation en aval. Il a initialement été approuvé en combinaison de la chimiothérapie standard IFL (association d'Irinotecan, de Fluorouracil et de Leucovorin) pour les patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRM) (Ferrara, Hillan, and Novotny 2005; Hurwitz et al. 2004). C'est le premier AAG mais surtout le premier traitement anti-cancéreux ayant montré un bénéfice clinique depuis 20 ans. L'association bevacizumab + IFL augmente la SSP de 4 mois (10,6 *versus* 6,2 mois) et la SG de 5 mois (20,3 *versus* 15,6 mois) par rapport au traitement IFL seul, respectivement (Hurwitz H, 2004). Il est actuellement utilisé en première et seconde ligne du CCRM. Son indication a rapidement été étendue à d'autres cancers comme le cancer du poumon non à petites cellules en première ligne, administré en association avec le carboplatine et le paclitaxel (Sandler et al. 2006). Le bevacizumab est également indiqué pour le cancer du rein avancé et/ou

métastatique en association avec l'interféron  $\alpha$  (Escudier et al. 2007) et les glioblastomes récidivants depuis 2009 en association avec l'irinotecan (Kreisl et al. 2009). Plus récemment, le cancer de l'ovaire a également obtenu une nouvelle indication en première ligne en association avec le carboplatine et le paclitaxel (Perren et al. 2011). L'utilisation du bevacizumab dans le cancer du sein métastatique est controversée, il est indiqué en association au paclitaxel ou au docetaxel en première ligne (Miller et al. 2007). Cependant, son indication a été retirée aux Etats-Unis du fait qu'il n'avait pas démontré son efficacité et sa sécurité pour les patientes. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF normalise les vaisseaux sanguins ce qui facilite l'administration de la chimiothérapie au sein de la tumeur et augmente son efficacité (Jain 2005). Ce qui expliquerait pourquoi le bevacizumab augmente la SG des patients en association avec une chimiothérapie et n'est pas efficace en monothérapie. Dans le traitement des glioblastomes, le bevacizumab est toutefois utilisé en monothérapie. En revanche, malgré des résultats satisfaisants, l'efficacité du bevacizumab est limitée. Dans la plupart des cas, la SSP est augmentée de quelques mois mais aucune augmentation de la SG n'est observée.

L'association du bevacizumab à une chimiothérapie a également été évaluée en situation adjuvante dans le CCR dans deux études. La SSP à trois ans, objectif principal de ces deux essais n'a pas été améliorée ni la SG (Allegra et al. 2011; de Gramont et al. 2012). D'autre part, la SG a été significativement diminuée dans une étude par rapport à la chimiothérapie seule montrant un caractère aggravant de cette association sur les patients (de Gramont et al. 2012). Dans un travail présenté plus loin, nous avons évalué l'effet du bevacizumab en association ou non avec une chimiothérapie en condition adjuvante sur un modèle animal permettant de tester cette situation clinique afin de déterminer les causes de cet échec. (Voir résultats : Partie II)

Le **ramucirumab** (Cyramza<sup>®</sup>) est un nouvel anticorps monoclonal spécifique du VEGFR-2. Il est indiqué en association avec le paclitaxel, dans le traitement des patients atteints d'un cancer gastrique avancé ou d'un adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne dont la maladie a progressé après une chimiothérapie à base de sels de platine et de fluoropyrimidine ; et en monothérapie lorsqu'un traitement en association avec le paclitaxel n'est pas approprié (Wilke et al. 2014; Fuchs et al. 2014).

## I-2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Les ITK se fixent de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP et bloquent ainsi l'activation des sites tyrosine kinase (TK). Par voie de conséquence, la signalisation cellulaire en aval est interrompue. Un grand nombre d'AAG de ce type sont actuellement utilisés en clinique ou en cours de développement dans des études précliniques ou cliniques. Tous ces inhibiteurs utilisent le même mécanisme d'action mais les récepteurs cibles, les caractéristiques pharmacocinétiques et les effets secondaires sont très différents d'un inhibiteur à l'autre. Plusieurs ITK ont été développés dans le but d'inhiber le VEGFR-2 cependant la plupart d'entre eux sont dits « multi-cibles » en raison d'une activité sur d'autres récepteurs TK que les VEGFR, situés sur la membrane des cellules tumorales. Parmi les ITK commercialisés actuellement les plus utilisés sont le sunitinib (Sutent<sup>®</sup>) et le sorafénib (Nexavar<sup>®</sup>). Le **sunitinib** cible les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), le récepteur FLT-3 ainsi que la kinase c-KIT et les récepteurs au PDGF. Il est indiqué dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST ou *GastroIntestinal Stromal Tumor*), en cas d'intolérance ou de résistance au traitement de référence, l'imatinib (Glivec<sup>®</sup>) (Heinrich et al. 2008). Le sunitinib est également indiqué dans le cancer du rein métastatique (Escudier, Roigas, et al. 2009) ou les tumeurs neuro-endocrines du pancréas non opérables ou métastatiques (Raymond et al. 2011). Le **sorafénib** cible aussi les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), le récepteur FLT-3 ainsi que la kinase c-KIT et les récepteurs au PDGF mais il inhibe en plus les kinases b-RAF et c-RAF. Le sorafénib est indiqué dans le traitement du carcinome hépatocellulaire avancés (Llovet et al. 2008) ainsi que dans le cancer du rein métastatique (Eisen et al. 2008; Escudier, Eisen, et al. 2009).

D'autres ITK ont plus récemment été développés comme l'axitinib (Inlyta<sup>®</sup>) ou le pazopanib (Votrient<sup>®</sup>). Ces inhibiteurs sont un peu plus spécifiques car ils ne ciblent que les récepteurs du VEGF, du PDGF et le récepteur c-KIT. L'**axitinib** est indiqué en 2<sup>ème</sup> ligne du traitement du cancer du rein avancé après échec d'un traitement antérieur par sunitinib ou cytokine. L'utilisation de l'axitinib augmente de façon significative la survie sans progression des patients atteints de cancer du rein par rapport au sorafénib (Rini et al. 2011; Motzer, Escudier, et al. 2013). Le **pazopanib** est indiqué dans le traitement en 1<sup>ère</sup> ligne des cancers du rein avancés et chez les patients préalablement traités par des cytokines à un stade avancé de leur maladie (Sternberg et al. 2010). Il est également indiqué dans le traitement des patients

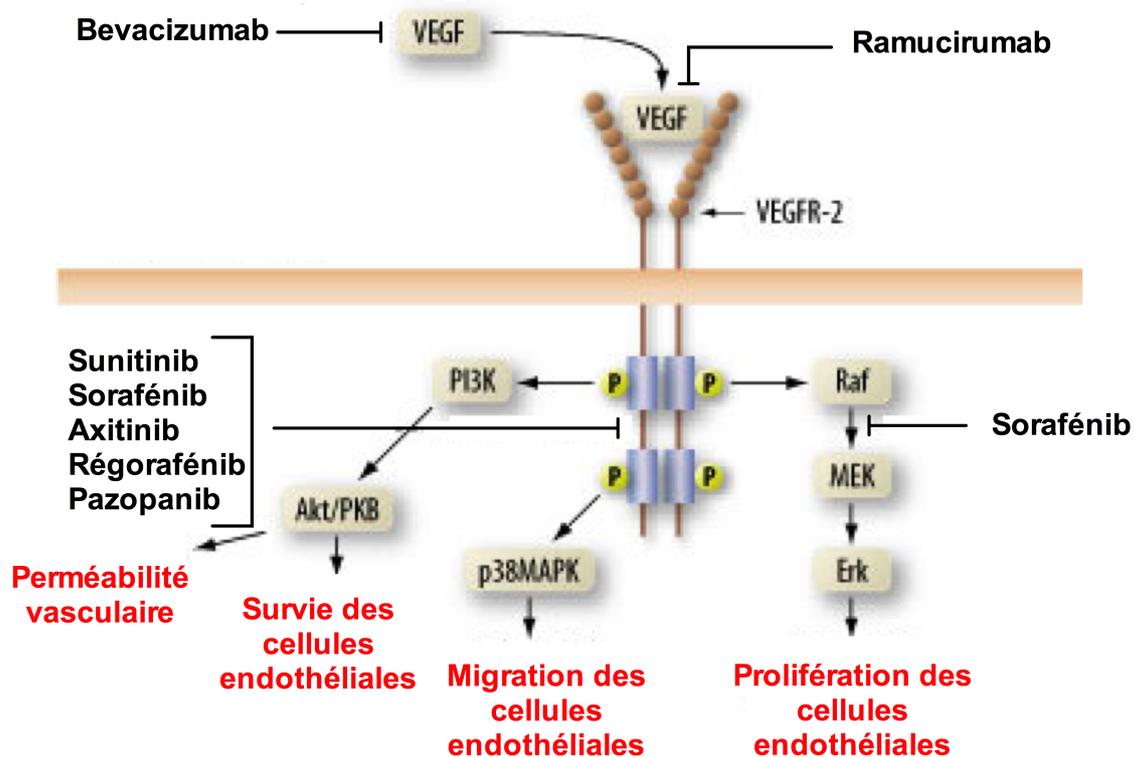
présentant des sous-types histologiques spécifiques de sarcomes de tissus mous avancés, qui ont été préalablement traités par chimiothérapie au stade métastatique ou qui ont progressé dans les 12 mois suivant en traitement (néo)adjuvant (Sleijfer et al. 2009). D'autres indications sont actuellement à l'étude notamment dans le cancer du sein ou du cancer de l'ovaire résistant au sel de platine.

Le **régorafénib** (Stivarga<sup>®</sup>) est le premier ITK à avoir une AMM pour les patients atteints de CCRM. Il concerne les patients ayant été traités antérieurement ou qui ne sont pas éligibles aux traitements disponibles, notamment une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, un traitement par anti-VEGF et un traitement par anti-EGFR (Grothey et al. 2013). Il est également indiqué dans les GIST non résecables ou métastatiques ayant progressé lors d'un traitement antérieur par imatinib et sunitinib ou en cas d'intolérance à ces traitements (Demetri et al. 2013).

Enfin, certains ITK prometteurs échoués également à montrer une efficacité clinique et sont par conséquent abandonnés. C'est le cas par exemple, du tivozanib (Motzer, Nosov, et al. 2013) et du linifanib (Cainap et al. 2015); alors que ces molécules sont spécifiques des VEGFR.

Il est également important de noter que ces ITK multi-cibles agissent donc à la fois sur les cellules endothéliales des vaisseaux péri-tumoraux et sur les cellules tumorales, leur conférant ainsi une activité anti-angiogénique et anti-proliférative. L'inhibition de ces autres cibles joue théoriquement un rôle important dans l'activité anti-tumorale de ces molécules et dans leur toxicité.

Les mécanismes d'action des différents anticorps monoclonaux et des ITK sont récapitulés dans la Figure 16.



**Figure 16. Mécanismes d'action des agents dirigés contre la voie VEGF/VEGFR.**

Le bevacizumab empêche la fixation du ligand (VEGF-A) sur les VEGFR. Le ramucirumab inhibe spécifiquement le VEGFR-2. Le sunitinib, le sorafénib, l'axitinib, le régorafénib et le pazopanib inhibent la phosphorylation sur les sites tyrosine kinase des VEGFR. Ce schéma représente un VEGFR-2, cependant, ces ITK sont tous multi-cibles. (Schéma adapté de <http://www.molecularonc.com/mor/mor010262.html>)

### I-3. Un récepteur hybride circulant du VEGF

Par la suite une autre catégorie d'AAG a été développée, dans le but d'optimiser l'inhibition de la néo-vascularisation tumorale ; l'**afibercept** (Zaltrap<sup>®</sup>). Il s'agit d'une protéine de fusion recombinante composée des fragments des domaines extracellulaires du VEGFR-1 et VEGFR-2 humain fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine, capable de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF. Il a été approuvé en 2012 par la FDA et en 2013 en Europe, en association avec la chimiothérapie irinotecan/5-fluorouracile/acide folinique (FOLFIRI) chez les adultes atteints d'un CCRM résistant ou ayant progressé après un traitement à base d'oxaliplatine (Van Cutsem et al. 2012). Cependant, il permet qu'une modeste amélioration de la SG au prix d'une toxicité non négligeable. De plus, il n'a pas démontré d'avantage clinique dans le traitement du cancer du poumon de type NSCLC (Ramlau et al. 2012) et de la prostate (Agarwal, Sonpavde, and Sternberg 2012). Son utilisation est par conséquent limitée.

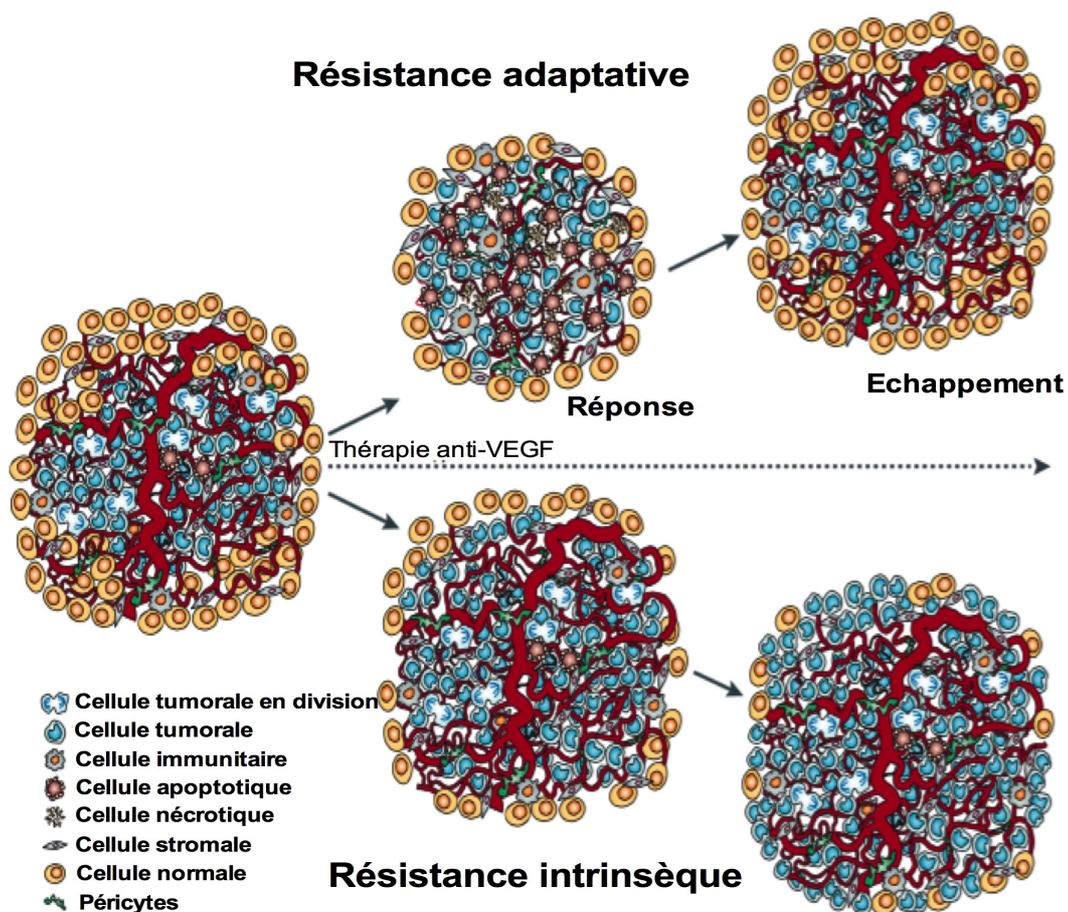
## II- Les mécanismes de résistances aux anti-angiogéniques

L'émergence des AAG a modifié pendant cette dernière décennie de façon majeure le pronostic de certains cancers. L'un des avantages théoriques majeurs des traitements AAG est que ces traitements ne présentent aucun risque de résistance compte tenu de la stabilité génétique présumé des cellules endothéliales. Cependant, comme les traitements conventionnels, ces nouvelles stratégies AAG sont encore caractérisées par un fort taux d'échec et une efficacité modeste. Les bénéfices des AAG sont en effet le plus souvent caractérisés par une augmentation de la SSP dans divers cancers mais ces effets se répercutent rarement sur la SG des patients.

Parmi ces patients, certains sont très répondeurs et vivent significativement plus longtemps. Certains, au contraire, vont être réfractaires au traitement dès le départ et vont être indifférents aux AAG, on parle de **résistance intrinsèque**. Mais la majorité des patients vont répondre puis échapper rapidement au traitement. Les tumeurs angiogéniques vont s'adapter à la présence des AAG, en développant de nouveaux moyens pour se soustraire fonctionnellement de ce blocage thérapeutique de l'angiogenèse, on parle de **résistance adaptative**. Ce concept d'échappement est très différent du concept traditionnel d'acquisition de résistances aux autres anti-cancéreux. Il ne s'agit pas d'une mutation affectant directement un gène codant pour une cible d'un médicament ou du métabolisme de la drogue. En effet, l'échappement est un mécanisme indirect, au cours duquel la tumeur va trouver un moyen alternatif de maintenir la croissance tumorale alors que la cible de l'AAG reste inhibée (Figure 17).

La résistance aux AAG se traduit donc par deux mécanismes principaux :

- La résistance adaptative
- La résistance intrinsèque



**Figure 17. Les deux modes de résistances aux traitements AAG.**

**La résistance adaptative.** Après une réponse initiale, la tumeur est capable de s'adapter et d'échapper aux AAG.

**La résistance intrinsèque.** Des conditions préexistantes à la tumeur lui permettent d'être insensible au traitement. Aucun bénéfice des thérapies AAG n'est observé, la tumeur va progresser sous traitement. (Schéma adapté d'après Bergers and Hanahan 2008)

Il existe quatre mécanismes de **résistances adaptatives**, caractéristiques de l'échappement aux AAG :

- 1- l'activation et/ou l'augmentation de voies alternatives de signalisations pro-angiogéniques,
- 2- le recrutement de cellules pro-angiogéniques dérivées de la moelle osseuse,
- 3- l'augmentation de la couverture péricytaire sur les vaisseaux tumoraux, permettant une stabilisation et une augmentation de l'intégrité vasculaire tumorale ainsi qu'une diminution de la dépendance du signal de survie du VEGF,
- 4- l'augmentation des mécanismes d'invasion et de dissémination métastatique.

Les résistances acquises aux AAG sont en effet fortement liées aux activations de voies alternatives de l'angiogenèse. Par exemple, le traitement anti-VEGFR-2 est suivi chez un modèle préclinique de tumeurs neuroendocrines pancréatiques (souris Rip1-Tag2) d'une augmentation de facteurs pro-angiogéniques tels que le bFGF ou l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Casanovas et al. 2005). Les auteurs montrent également que l'hypoxie tumorale induite par l'anti-VEGFR-2 est associée à l'augmentation de ces facteurs pro-angiogéniques. Sur un modèle de CCR *in vitro* un traitement anti-VEGF augmente l'activation de FGF-2 (bFGF), PlGF et les récepteurs du VEGF (VEGFR-1 et 2) (Tomida et al. 2015). De plus, sur un modèle Rip1-Tag2 un traitement anti-VEGF ou au sunitinib induit une majoration de l'expression de HIF-1 et c-MET (récepteur de l'HGF) (Sennino and McDonald 2012). De la même manière, chez l'homme, des niveaux élevés de bFGF et Tie-2 (récepteurs d'Ang-1 et angiopoïétine-2) circulants ont été observés chez des patients porteurs de glioblastome, après traitement au cediranib, un ITK anti-VEGFR (Batchelor et al. 2007).

Outre ces mécanismes d'activation de voies alternatives, une augmentation du G-CSF et SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*), facteurs de croissance médullaire, capables de mobiliser les cellules souches endothéliales progénitrices circulantes, a également été observée chez la souris (Natori et al. 2002; Ceradini et al. 2004). En clinique, une augmentation de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse VEGFR-2<sup>+</sup> a été associées à une baisse significative de la SG chez des patients atteints de cancer avancé, par rapport aux patients avec de faible taux de ces cellules (Massard et al. 2012). Le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans un rebond pro-angiogénique secondaire à une mobilisation des précurseurs endothéliaux a été évoqué suite aux résultats d'une étude évaluant le bevacizumab chez des patients porteurs d'un glioblastome (Sathornsumetee et al. 2008).

La possibilité d'une synergie entre ces deux premiers mécanismes de résistance acquise pourrait être à l'origine d'une rapide reprise de la croissance tumorale après arrêt d'un traitement AAG (Mancuso et al. 2006).

Le remodelage vasculaire associé à l'administration des AAG pourrait contribuer à diminuer progressivement la sensibilité à ces traitements : les vaisseaux matures remodelés sont en effet moins sensibles à l'inhibition de l'angiogenèse que les vaisseaux immatures ou néoformés (Bergers et al. 2003). Une augmentation de la couverture des vaisseaux par des péricytes sous traitement AAG a été observée. Par ailleurs, ces péricytes participent à la maturation des vaisseaux tumoraux (Benjamin, Hemo, and Keshet 1998). Ainsi, compte tenu du rôle

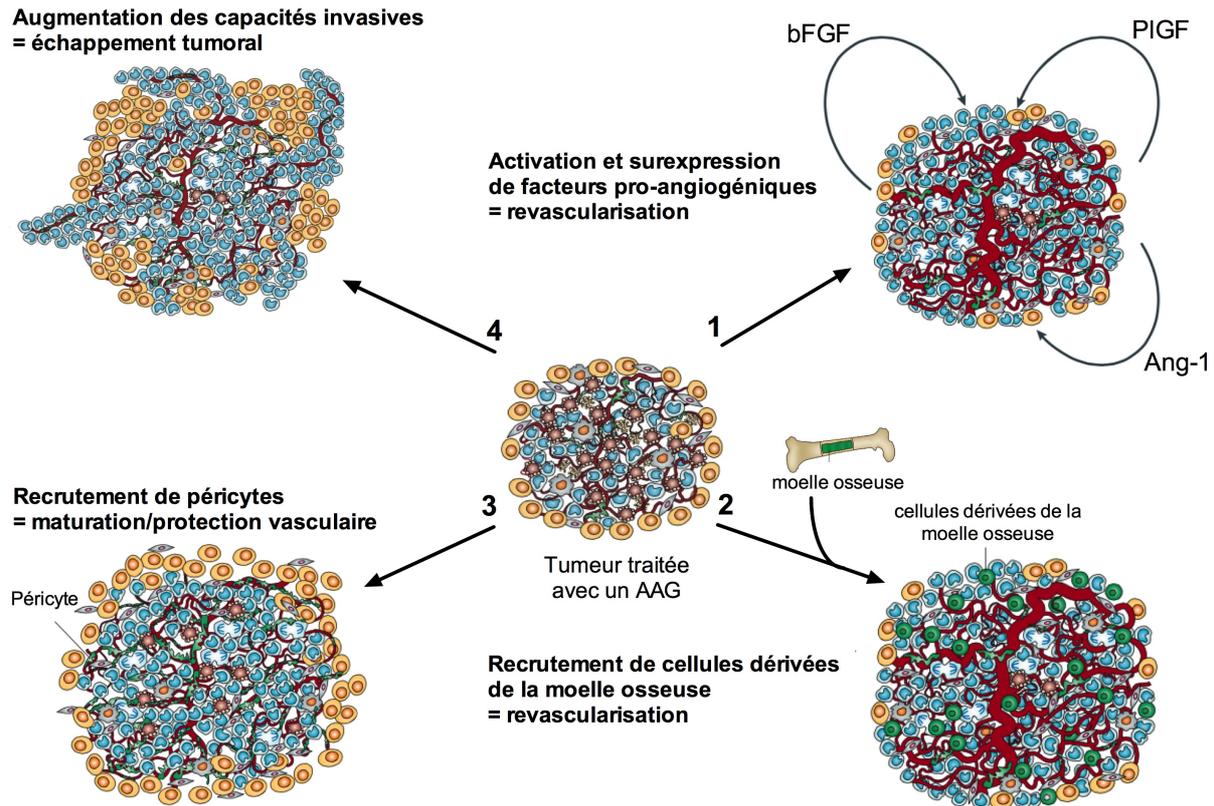
stabilisateur des péricytes sur les cellules endothéliales et de leur capacité à favoriser la survie des cellules vasculaires en l'absence de signalisation par le VEGF-A, un double ciblage des cellules endothéliales/péricytes semble être une piste thérapeutique prometteuse pour améliorer l'efficacité des traitements AAG.

Enfin, une augmentation des capacités invasives des cellules tumorales dans les tissus adjacents a également été observée chez des patients atteints de glioblastome traités au bevacizumab (Norden et al. 2008).

Les mécanismes de résistances adaptatives sont schématisés sur la Figure 18.

Certains patients sont d'emblé insensibles aux traitements AAG. La **résistance intrinsèque** pourrait être définie comme la poursuite de la croissance tumorale lors de l'initiation du traitement AAG. Ses mécanismes sont néanmoins, moins bien documentés. Ils pourraient être semblables à ceux de la résistance acquise mais préexister à l'utilisation de tout AAG, se développant spontanément sur des bases génétiques initiales ou en raison d'une pression environnementale particulière dès la phase de développement précoce, voire dès le stade précancéreux. Cette résistance intrinsèque pourrait ainsi relever des mécanismes suivants :

- 1- La préexistence de multiples signaux pro-angiogéniques (Relf et al. 1997),
- 2- La préexistence d'une infiltration de cellules inflammatoires (cellules myéloïdes CD11b+Gr1+ en particulier) qui protègent les vaisseaux en sécrétant divers agents pro-angiogéniques (Shojaei et al. 2007),
- 3- L'hypo-vascularité naturelle des tumeurs dont la croissance est indépendante, entraînant un impact négligeable des AAG (J. L. Yu et al. 2001),
- 4- Le statut invasif et métastatique préexistant, lui permettant l'utilisation, pour sa croissance, des vaisseaux normaux sans recours obligatoire à la néo-angiogenèse (Kaur et al. 2004).



**Figure 18. Les quatre types de résistances adaptatives aux traitements AAG.**

On observe : 1- Sous AAG une production de facteurs pro-angiogéniques qui permet l'activation de voies de signalisation alternative indépendante de la voie VEGF/VEGFR. Cela entraîne une reprise de la vascularisation et de la croissance tumorale ; 2- La production de certaines cytokines sous traitement, tel que le SDF-1 qui favorise le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules permettent la néo-vascularisation et la progression tumorale ; 3- Sous AAG une augmentation du recrutement des péricytes. Cette normalisation vasculaire entraîne une maturation des vaisseaux tumoraux et favorise la résistance aux traitements AAG ; 4- Sous traitement une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales. La dissémination de ces cellules favorise la formation de métastases sous traitement. (Schéma adapté d'après Bergers and Hanahan 2008)

Les principales stratégies thérapeutiques actuelles visant à dépasser ces résistances aux AAG consistent ainsi en la combinaison d'un AAG et d'un agent contre une cible surexprimée suite au phénomène de résistance. Par exemple, une thérapie ciblée comme un inhibiteur c-MET ou l'administration d'un agent ciblant les péricytes. Nous traiterons ci-dessous, les principales pistes étudiées pour prévenir ou combattre ces phénomènes de résistances.

### **III- Prévenir les mécanismes de résistances aux AAG**

#### **III-1. Cibler plusieurs facteurs pro-angiogéniques**

L'action d'un grand nombre de facteurs de croissance compense l'inhibition de la signalisation du VEGF et contribue à l'apparition de résistances au traitement. Ce mécanisme de relais favorise l'angiogenèse tumorale indépendamment du VEGF. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer par exemple, les angiopoïétines (J. Huang et al. 2009), le PlGF (Rolny et al. 2011), le FGF (Alessi et al. 2009), CXCL8 (Grepin et al. 2012; D. Huang et al. 2010) et le PDGF (Cao and Liu 2007; P. M. Ellis and Al-Saleh 2012; Hutson et al. 2010; Roskoski 2007) dont différentes études ont montré l'implication dans l'échappement aux thérapies anti-VEGF. L'inhibition simultanée des deux voies de signalisation, VEGFR-2 et VEGFR-3 est proposée afin de limiter ces résistances et d'améliorer l'efficacité du traitement anti-angiogénique (Sallinen et al. 2009; Tammela et al. 2008). En préclinique, inhiber la signalisation FGF (Casanovas et al. 2005) augmente l'efficacité des inhibiteurs du VEGF. Les niveaux plasmatiques de PlGF augmentent chez les patients atteints de CCR (Willett et al. 2005), de cancer du rein (Rini et al. 2009) ou de glioblastome (Batchelor et al. 2007) traités par des anti-VEGF. L'association d'un anti-PlGF et du bevacizumab n'a cependant pas montré de bénéfice clinique supérieur au bevacizumab seul chez des patients atteints de glioblastome (Lassen et al. 2015), alors que sur un modèle de souris, l'inhibition du PlGF montre une activité anti-tumorale (Van de Veire et al. 2010). D'autres études sont donc nécessaires pour vérifier l'efficacité de l'adjonction d'un anti-PlGF au bévacizumab (ou autre inhibiteur de la voie VEGF/VEGFR) et dans d'autres cancers notamment. En revanche, la plupart des ITK sont déjà multi-cibles. De plus, la multitude de facteurs pouvant prendre le relais du VEGF et favoriser l'angiogenèse est très importante. De nombreuses études sont actuellement en cours pour développer des agents thérapeutiques suivant cette approche. La question de la faisabilité et de la pertinence de cette approche est donc posée.

#### **III-2. Cibler la voie de signalisation de l'HGF**

L'inhibition de la signalisation du VEGF entraîne une activation d'autres récepteurs et des voies de signalisation en aval, parmi celles-ci la voie de signalisation HGF/c-MET (Sennino and McDonald 2012). Cette dernière favorise en effet la mobilité et la prolifération cellulaire, leur potentiel invasif et, par conséquent, le risque de dissémination métastatique (Birchmeier et al. 2003; Pennacchietti et al. 2003). Or, l'inhibition du VEGF favorise un phénotype pro-

invasif des cellules tumorales chez la souris et chez des patients traités au bévacizumab. L'inhibition de la voie HGF/c-MET est donc une approche intéressante pour prévenir ce phénomène. Dans un modèle de cancer pancréatique, le blocage simultané de VEGF et de MET inhibe l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la formation de métastases (You et al. 2011; Sennino and McDonald 2012). Un ITK anti-c-MET et anti-VEGFR-2 a obtenu un AMM par la FDA en Novembre 2012, le cabozantinib (Cometriq<sup>®</sup>). Il est indiqué dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde, localement avancé ou métastatique, progressif et non résecable de l'adulte. Les résultats de l'étude clinique montre une amélioration de la PFS de 7 mois par rapport aux patients placebo, néanmoins une amélioration de la SG n'a pas été observée (Viola, Cappagli, and Elisei 2013). Un anticorps monoclonal humanisé anti-MET a également été développé, l'onartuzumab. Il a été testé en association avec le bevacizumab et/ou la chimiothérapie de référence dans divers cancers, notamment dans le cancer du sein et le CCRM, mais il n'a montré aucune amélioration de la PFS (Diéras et al. 2015; "A Randomized, Double-Blind, Phase II Study of First-Line FOLFOX plus Bevacizumab with Onartuzumab versus Placebo in Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC)." 2015). Il est néanmoins toujours testé dans d'autres cancers, comme le cancer du poumon non à petites cellules avec différentes combinaisons de traitement ou en combinaison avec le mFOLFOX6 en phase III dans les cancers gastro-œsophagiens.

### III-3. L'hypoxie comme cible thérapeutique

Les traitements AAG en bloquant l'angiogenèse tumorale induisent une diminution rapide et importante du réseau vasculaire intra-tumorale, entraînant une augmentation de l'hypoxie et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Cet environnement hypoxique va aboutir à l'apparition de résistance en sélectionnant des cellules tumorales plus agressives capables de survivre dans un environnement pauvre en oxygène (Semenza 2010). Cibler HIF-1 $\alpha$  et l'angiogenèse est une stratégie potentielle pour limiter les phénomènes de résistance aux AAG. Le topotécan (Hycamtin<sup>®</sup>), un inhibiteur de la topoisomérase-1, inhibe la traduction de HIF-1 $\alpha$  par un mécanisme indépendant des dommages à l'ADN (Rapisarda et al. 2004). Dans un modèle de glioblastome l'association bévacizumab et du topotécan limite la croissance tumorale par rapport au traitement bévacizumab seul (Rapisarda et al. 2009). Cependant, à nouveau en clinique, l'association du topotécan et du cetuximab en phase II n'a pas montré d'augmentation de la SSP et de la SG par rapport aux patients traités avec l'association

irinotecan et cetuximab chez des patients atteints de CCR avancés (Garrett et al. 2013). L'association du topotécan en association avec un AAG est actuellement testée dans d'autres indications notamment, en phase II dans les cancers ovariens ou péritonéaux en association avec le gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), un anti-EGFR ainsi qu'en phase I en oncologie pédiatrique chez des patients atteints de tumeurs solides récidivantes ou réfractaires en association avec le pazopanib. Une autre molécule le Evofosfamide (TH-302) qui présente spécifiquement une cytotoxicité en condition d'hypoxie est en cours d'évaluation en association avec le sunitinib chez des patients atteints de cancers du rein avancés, de GIST et de tumeur pancréatique neuroendocrine.

En conclusion, un espoir important a été porté sur les AAG. Dans les modèles précliniques de réels bénéfices des AAG ont été observés. En revanche, elles sont très souvent limitées en clinique. En effet, très peu de patients bénéficient d'un réel gain sur leur SG. Certains patients développent en l'occurrence une résistance aux traitements alors que d'autres sont réfractaires dès le départ (Bergers and Hanahan 2008). Les mécanismes de résistances aux AAG sont multiples mais l'association d'agents ciblant le VEGF à d'autres inhibiteurs multi-cibles ou ciblant un de ces mécanismes, pourrait être une approche prometteuse pour les dépasser et potentialiser l'effet de ces thérapies. Cependant, dépasser la résistance aux AAG semble complexe et les premières approches sont décevantes. Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'angiogenèse tumorale et de résistances aux AAG est indispensable afin d'améliorer l'efficacité des thérapies AAG. La place des AAG en adjuvant reste d'ailleurs encore à définir. Des marqueurs d'efficacité des traitements sont essentiels. Pourtant aucun n'est validé et utilisé en routine pour sélectionner les patients potentiellement répondeurs au traitement (Jain et al. 2009). Face à cette efficacité modérée des AAG certains proposent des modèles précliniques plus adaptés (Francia et al. 2011) et d'autres étudient les modes de résistances aux traitements (Bergers and Hanahan 2008; Ebos and Kerbel 2011).

# **CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**



Le début des années 2000 a vu naître des traitements inédits, les anti-angiogéniques, avec l'espoir de limiter, voire éradiquer, le développement des cancers solides. L'émergence de ces thérapies ciblant l'angiogénèse tumorale a modifié pendant la dernière décennie de façon majeure le pronostic de certains cancers. Cependant, comme les traitements conventionnels, ces nouvelles stratégies anti-angiogéniques sont encore caractérisées par un fort taux d'échec et une efficacité modeste. Les gains limités en termes de SSP et de SG qui se chiffrent le plus souvent en mois, sont souvent associés à des mécanismes de résistance.

L'objectif de cette thèse découle de deux constats cliniques sans appel. De nombreuses études cliniques ont mis en évidence d'une part, une rapide reprise de la croissance tumorale après arrêt du traitement AAG. D'autre part, l'association du bevacizumab à la chimiothérapie de référence a été testée chez des patients en situation adjuvante. Aucune différence de la SSP n'a été observée avec de plus une diminution significative de la SG pour les patients traités avec l'association de bevacizumab et chimiothérapie.

La première partie de notre travail a eu pour but de vérifier qu'un traitement discontinu aux AAG induit une rapide reprise de la croissance tumorale. Pour cela, nous avons testé sur des souris *nude* xenogreffées avec des tumeurs coliques dérivées de patients, trois schémas thérapeutiques différents au bevacizumab, comparant des traitements discontinus à des traitements continus. Par ailleurs, un de nos objectifs a été de vérifier le rôle relatif des mécanismes de résistances aux AAG qui ont été décrits précédemment dans le cas des traitements discontinus. Ceci fait l'objet d'un article soumis.

La deuxième partie de notre travail avait pour but de développer un modèle préclinique de CCR pertinent afin de tester l'effet du bevacizumab en association ou non avec une chimiothérapie, en condition adjuvante, afin de déterminer les causes de la non-efficacité de l'adjonction du bevacizumab en clinique. Pour ce faire nous avons procédé aux différentes étapes :

- 1) valider le premier modèle animal permettant de tester cette situation clinique,
- 2) a) déterminer l'effet sur la prolifération tumorale du bevacizumab en adjuvant de la résection chirurgicale dans le CCR,  
b) déterminer l'effet d'un schéma de traitement adjuvant associant du fluorouracile (5-FU) / oxaliplatine et du bevacizumab dans un modèle adjuvant.



# RESULTATS



## Partie I

### Article 1

Discontinuous schedule of bevacizumab in colorectal cancer induces accelerated tumor growth and phenotypic changes

Selma Becherirat, Fatemeh Valamanesh, Mojgan Karimi, Anne-Marie Faussat, Jean-Marie Launay, Cynthia Pimpie, Amu Therwath, Marc Pocard

Article en soumission dans le journal : British Journal of Cancer

### Contexte scientifique et objectif

Les AAG ciblant la voie du VEGF constituent, depuis quelques années, un nouvel outil thérapeutique qui a permis d'allonger significativement la survie des patients atteints de CCRM, mais cet effet est transitoire. L'arrêt des AAG peut conduire à un phénotype tumoral plus agressif et invasif, avec une capacité métastatique accrue. De nombreuses études cliniques ont observé qu'une fois l'AAG interrompu ou durant une inter-cure, s'ensuit une rapide reprise de la vascularisation et un important « rebond » de la croissance tumorale. Quatre mécanismes de l'échappement aux AAG ont été décrits:

- 1- l'activation et/ou l'augmentation de voies alternatives de signalisations pro-angiogéniques
- 2- le recrutement de cellules pro-angiogéniques dérivées de la moelle osseuse
- 3- l'augmentation de la couverture péricytaire sur les vaisseaux tumoraux, permettant une stabilisation et une augmentation de l'intégrité vasculaire tumorale ainsi qu'une diminution de la dépendance du signal de survie du VEGF
- 4- l'augmentation des mécanismes d'invasion et de dissémination métastatique.

Bien que les mécanismes de résistance aient été largement étudiés, aucune étude n'a été menée dans le cas d'interruption temporaire ou définitive. Il était donc intéressant d'étudier l'implication de ces mécanismes lors d'un contexte de traitement discontinu.



De plus, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation des CSC médiée par l'hypoxie. L'hypothèse actuelle est que ces CSC serait en l'occurrence une importante source de reprise de la croissance tumorale et de l'accélération de la progression de la maladie. Une quantification des CSC a par conséquent également été réalisée.

La finalité de cette étude est d'identifier les mécanismes mis en jeu dans l'accélération de la maladie, ceci nous permettrait d'anticiper l'apparition des résistances et d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de CCR avancés.

## Résultats

### Vascularisation tumorale

La régression ainsi que la revascularisation tumorale a été étudiée par immunofluorescence, le marqueur CD31 a été utilisé pour marquer les cellules endothéliales et la desmine pour les péricytes. Une diminution significative a été mise en évidence uniquement pour le CD31 dans le groupe A par rapport au groupe B (schéma 30J). Cependant, dans le groupe D après arrêt du traitement une forte reprise de la vascularisation tumorale a été observée composée d'une augmentation significative de cellules positives pour le CD31 (cellules endothéliales) et de cellules positives pour la desmine (péricytes) par rapport au groupe C (schéma 50J). En revanche, dans le schéma 70J, une augmentation significative a été notée dans le groupe F par rapport au groupe E des cellules CD31<sup>+</sup> seul. De manière inattendue, une augmentation significative des cellules desmine<sup>+</sup> dans le groupe E a été mise en évidence. Cette augmentation de cellules desmine<sup>+</sup> pourrait indiquer que dans le cas d'une régression des vaisseaux composés de cellules CD31<sup>+</sup>, les péricytes sont capables de prendre le relais de la néo-vascularisation tumorale. De plus, nous pouvons noter que dans les 3 schémas thérapeutiques, l'inhibition du VEGF en continu par le bevacizumab induit la régression des vaisseaux tumoraux dans les groupes A, C et E.

### Facteurs pro-angiogéniques et HIF-1 $\alpha$

Nous avons ensuite étudié l'influence du bevacizumab sur notre modèle murin de CCR pour induire des changements moléculaires pendant et après arrêt du traitement. Pour cela, nous avons, quantifié le VEGF et le PlGF en intra-tumoral par ELISA et dans le plasma par radio-immunologie. L'HGF a également été quantifié dans le plasma par radio-immunologie. Nous avons observé que le bevacizumab inhibe significativement le VEGF et ce même durant un

traitement prolongé. Réciproquement, dans les groupes avec un traitement interrompu, une augmentation significative a été observée. En intra-tumoral, l'augmentation de VEGF a été constatée dans le groupe F uniquement (schéma 70J). Néanmoins, dans le plasma l'augmentation de VEGF était significative dans les groupes D et F, avec une augmentation de 81 % pour le groupe D par rapport au groupe C et de 88 % pour le groupe F par rapport au groupe E. Ces résultats ont mis évidence que même lors de la reprise du traitement, les tumeurs sont capables d'échapper au bevacizumab. Aucune différence entre les différents groupes n'a été observée pour le PlGF en intra-tumoral mais de la même manière que pour le VEGF, l'interruption du bevacizumab a induit une augmentation significative du PlGF et de l'HGF dans le plasma dans les groupes D et F par rapport aux groupes C et E, respectivement (schéma 50J et 70J).

L'effet d'un traitement discontinu au bevacizumab, sur l'hypoxie, a par ailleurs été étudié en quantifiant HIF-1 $\alpha$  en intra-tumoral par ELISA. Seul le groupe F présentait une diminution significative par rapport au groupe E (schéma 70J). De façon surprenante, une diminution significative a été constatée entre le groupe A par rapport au groupe C et entre le groupe A par rapport au groupe E. Ces résultats semblent supposer un lien entre la diminution de HIF-1 $\alpha$  et l'augmentation des facteurs pro-angiogéniques.

### **Cellules endothéliales progénitrices**

Nous avons quantifié par cytométrie en flux les CEP ainsi que son effecteur le SDF-1 $\alpha$  dans le plasma par ELISA. Aucune différence n'a été observée entre les différents groupes. Les CEP ne semblent donc pas intervenir dans le processus de revascularisation tumorale et donc dans la reprise de la croissance tumorale après arrêt du bevacizumab.

### **Cellules souches cancéreuses**

Afin de déterminer si les CSC sont impliquées dans la rapide reprise de la croissance tumorale après arrêt des AAG dans le CCR, nous avons examiné le changement phénotypique de nos tumeurs dans les trois schémas thérapeutiques en quantifiant les CSC par cytométrie en flux. Nous avons pour cela utilisé des marqueurs déjà identifiés sur des CSC dans le CCR et analysé deux sous-populations. Dans le schéma 30J et pour les deux sous-populations, aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes A et B. En revanche, dans les groupes avec interruption de traitement (groupe D et F), une augmentation significative des CSC a été observée par rapport aux groupes C et E, respectivement, et ce pour les deux sous-populations.

Nous avons observé jusque 90 % d'augmentation de CSC dans une des sous-populations du groupe F par rapport au groupe E. Ces résultats suggèrent que les CSC auraient une forte implication dans la reprise de la croissance tumorale après arrêt du bevacizumab.

## Conclusion

Ce travail nous a permis de mettre en évidence différents mécanismes pouvant être impliqués dans la rapide reprise de la croissance tumorale observée dans plusieurs études cliniques après arrêt des AAG. Dans notre étude, nous avons effectivement observé qu'après arrêt du bevacizumab, s'ensuit une rapide reprise de la vascularisation et de la croissance tumorale. Les mécanismes de résistances décrits par *Bergers et Hanahan* comme l'activation de facteurs pro-angiogéniques tels que le PlGF et l'HGF ainsi que le recrutement de péricytes semblent en effet impliqués. Ce travail nous a également permis de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Nos expériences semblent montrer que la diminution significative de HIF-1 $\alpha$  entre les groupes E et F est due au fait qu'en début de traitement une hypoxie importante se serait installée au sein de la tumeur. Cependant, l'augmentation des facteurs pro-angiogéniques suivi de la vascularisation tumorale pourrait expliquer la diminution de HIF-1 $\alpha$ . La combinaison d'AAG et de traitement ciblant l'hypoxie est actuellement testée en préclinique et clinique, ceci pourrait être une stratégie potentielle pour limiter l'échappement au traitement anti-VEGF. Nous démontrons également dans notre étude que l'arrêt du bevacizumab modifie le profil d'expression des xénogreffes de CCR en augmentant de manière significative des CSC. Ces observations ne remettent pas en cause l'utilisation du bevacizumab en clinique puisque ce traitement présente des effets thérapeutiques évidents. Cependant, nos expériences semblent présenter un échappement thérapeutique déjà observé chez des patients. Tout développement futur de traitement AAG requiert une meilleure compréhension des mécanismes, dont cette hétérogénéité tumorale qui se met en place ainsi que comment la cibler efficacement. C'est un objectif clé, non seulement pour la thérapie AAG, mais aussi pour beaucoup de traitements ciblant le cancer. Par ailleurs, une récente étude clinique (Simkens et al. 2015) en testant la «thérapie d'entretien» vient de montrer que l'inhibition du VEGF par le bevacizumab doit être maintenue et nos résultats fournissent une explication.

**Title page**

**Manuscript title:**

**Discontinuous schedule of bevacizumab in colorectal cancer induces accelerated tumour growth and phenotypic changes**

**Authors:**

Selma Becherirat<sup>1</sup>, Fatemeh Valamanesh<sup>1</sup>, Mojgan Karimi<sup>1</sup>, Anne-Marie Faussat<sup>2</sup>, Jean-Marie Launay<sup>3</sup>, Cynthia Pimpie<sup>1</sup>, Amu Therwath<sup>1</sup>, Marc Pocard<sup>1</sup>

**Authors affiliations:**

<sup>1</sup> INSERM U965 CART: Carcinomatosis Angiogenesis and Translational Research, University of Paris 7-Diderot, Lariboisière Hospital, 8 rue Guy Patin 75475 Paris cedex 10 – France.

<sup>2</sup> Cytometry platform IFR 65, Faculty of medicine, Hospital Saint Antoine, Paris, France.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Inserm U942, Lariboisière Hospital, Paris, France.

Corresponding author:

[marc.pocard@inserm.fr](mailto:marc.pocard@inserm.fr)

[selma.becherirat@inserm.fr](mailto:selma.becherirat@inserm.fr)

Phone: 00 331 53 21 67 50

Fax: 00 331 53 21 67 39

**Short title:** Discontinuous schedule of bevacizumab favors tumour regrowth

**Keywords:** Bevacizumab, Colorectal cancer, Angiogenesis, Resistance, Cancer stem cells

**Abbreviations used:** AAG: Anti-angiogenic; CRC: Colorectal cancer; CSC: Cancer stem cells; PDX: Patient-derived xenograft; VEGF: Vascular endothelial growth factor; PlGF: Placental growth factor; HGF: Hepatocyte growth factor; HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; SDF-1 $\alpha$ : Stromal derived factor 1 $\alpha$

**Appropriate article category:** Cancer therapy

**Novelty and impact:** This work focuses on previous clinical trial showing that a discontinuous schedule of anti-angiogenics leads to acceleration of cancer. We indeed found that a discontinuous schedule of bevacizumab induces an acceleration of tumour growth, an up-regulation of pro-angiogenic factors but above all, that it induces a modification of the heterogeneity of the colorectal cancer xenografts. These results throw some light on the events involved will improve the management and monitoring of patients.

## **Abstract**

Anti-angiogenics administration in colorectal cancer patients seemed promising therapeutic approach. In spite of early encouraging results, it however gave only modest clinical benefits. When AAG was administered with discontinuous schedule the disease showed acceleration in certain cases. Though resistance to AAG has been extensively studied, it is not documented for discontinuous schedules. To simulate clinical situations we subjected a patient-derived CRC subcutaneous xenograft in mice to 3 different protocols: 1- AAG (bevacizumab) treatment for 30 days (group A). Group B was the control, 2- bevacizumab treatment for 50 days (group C) and bevacizumab for 30 days and 20 without treatment (group D), 3- bevacizumab treatment for 70 days (group E) and 70 days treatment with a drug-break period between day 30 and 50 (group F). The tumour growth was monitored and at sacrifice the vascularity of tumours were measured and the pro-angiogenic factors quantified. Tumour phenotype was studied by quantifying cancer stem cells. Interrupting bevacizumab during treatment accelerated tumour growth and revascularization. A significant increase of pro-angiogenic factors was observed when therapy was stopped. On withdrawal of bevacizumab, as also after the drug-break period, the plasmatic VEGF increased significantly. Similarly, a notable increase of CSCs after the withdrawal and drug-break period of bevacizumab was observed ( $p < 0.01$ ). The present study indicates that bevacizumab treatment needs to be maintained because discontinuous schedules tend to trigger tumour regrowth, increase tumour resistance and CSC heterogeneity.

## Introduction

Angiogenesis is a fundamental event in tumour growth, progression and metastasis. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic molecule, is associated with tumour progression and metastatic dissemination in several solid and hematopoietic malignancies (Stoeltzing *et al*, 2003). The role played by VEGF has led to the development of therapeutic strategies that selectively target this pathway. Bevacizumab (Avastin), a humanized monoclonal anti-VEGF antibody, the first anti-angiogenesis drug approved in combination with chemotherapy, was shown to prolong survival in patients with metastatic colorectal cancer (CRC) (Hurwitz *et al*, 2004). Nevertheless, after several years of anti-VEGF therapy in patients with solid tumours, the benefits are found less than satisfactory. Most patients, whatever their tumour types, ultimately exhibit resistance to VEGF-targeted therapy. Moreover, when anti-angiogenics (AAG) are administered on a discontinuous schedule or during drug-break periods (because of secondary transitory effects or choice of strategy), tumour re-growth has sometimes been observed (Burstein *et al*, 2008; Cacheux *et al*, 2008; Johannsen *et al*, 2009). A rapid tumour vasculature and re-growth has also been shown when AAG therapy was halted (Mancuso *et al*, 2006; Griffioen *et al*, 2012). These observations could have clinical implications. In a continuous treatment program, it resulted in the prolongation of survival time in spite of tumour progression, as was noted in a recent clinical trial (Bennouna *et al*, 2013). In clinical practice, AAG treatment may be temporarily halted or definitely abandoned. Though resistances to AAG have been extensively studied, it has not been documented in case of temporary interruption or definitive abandon.

The hypothesis therefore is that the neovascularized tumours can adapt to the presence of angiogenesis inhibitors, evade the therapeutic blockade imposed on angiogenesis (Casanovas *et al*, 2005; Miller *et al*, 2005) and develop resistance. The current experimental evidence, suggests that there are at least four distinct adaptive mechanisms during evasion to AAG

therapies: (1) increased pericyte coverage of the tumour vasculature, serving to support its integrity and attenuate the necessity for VEGF-mediated survival signaling; (2) activation and/or up-regulation of alternative pro-angiogenic signaling pathways within the tumour; (3) recruitment of bone marrow-derived pro-angiogenic cells; (4) activation and enhancement of invasion and metastasis to provide access to normal tissue vasculature without obligate neovascularization (Bergers & Hanahan, 2008; Ellis & Hicklin, 2008).

There are reports showing that inhibition of VEGF signaling *in vitro* and *in vivo* leads to compensatory increase in the expression of VEGF family ligands (Bergers & Hanahan, 2008; Ellis & Hicklin, 2008; Ebos *et al*, 2009b; Fan *et al*, 2011). In view of these results, Yamagishi, and collaborators postulated that the phenotypic changes induced by chronic inhibition of VEGF did not necessarily depend on compensatory pathways activated by VEGF family ligands but could most likely be attributed to other pathway(s) (Yamagishi *et al*, 2013). Many studies have similarly shown that loss of VEGF signaling in cancer cells, induced by either VEGF pathway targeting agents or *Vegf* gene disruption, enhances migration, invasion and metastasis of tumour cells *in vitro* as well as *in vivo* (Ebos *et al*, 2009a; Pàez-Ribes *et al*, 2009; Fan *et al*, 2011; Yamagishi *et al*, 2013). Actually, we now know that other pro-angiogenic signaling pathways can stimulate blood vessel growth and promote blood vessel survival even when the VEGF-pathway is blocked. Pre-clinical studies have identified numerous candidates involved including epidermal growth factor; EGF (Cascone *et al*, 2011), fibroblast growth factor 1 and 2; FGF1 and FGF2 (Casanovas *et al*, 2005; Welti *et al*, 2011), hepatocyte growth factor; HGF(Shojaei *et al*, 2010) and placental growth factor; PlGF (Fischer *et al*, 2007). PlGF is a VEGF homolog. Clinical studies have shown that PlGF levels correlate with poor prognosis in various cancers including CCR and are also up-regulated in cancer patients treated with VEGF inhibitors (Fischer *et al*, 2008). In the same way, HGF has also been identified in the vast majority of solid tumours (Peruzzi & Bottaro, 2006), that are associated

with an aggressive phenotype and poor prognosis (Graziano *et al*, 2011). It has also been demonstrated that Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) plays an important role in the resistance to VEGF inhibition (Kim *et al*, 2013). It has been proposed that the inhibition of VEGF-pathway could lead to increase of hypoxia, which in turn could induce a selection of tumour cells able to survive in low oxygen environment (Hirota & Semenza, 2006), it may also follow alternate compensatory pro-angiogenic pathways enabling persistent neovascularization (Rapisarda & Melillo, 2009).

Because of their self-renewal and multi-potent properties, the current hypothesis is that cancer stem cells (CSCs) are another important source for recurrent tumour growth and accelerated disease progression. The increase of CSCs in response to hypoxia has first been reported in glioblastoma and breast cancer (Heddleston *et al*, 2009; Conley *et al*, 2012) and more recently in colon cancer (Lin *et al*, 2013). Based on experimental evidence, we can conceive broadly the mechanism behind evasive resistance but little is known, about the reversibility of these changes after cessation of anti-VEGF therapy.

In the current study we demonstrate, in a Patient-Derived (PDX) colon cancer xenograft mice model, that a discontinuous schedule of bevacizumab effectively induces an acceleration of tumour growth, a rapid revascularization and an up-regulation of pro-angiogenic factors but above all it induces a modification of the heterogeneity of the CRC xenografts by significantly increasing the CSCs.

The present work endeavors to determine whether a withdrawal or a drug-break period actually accelerates the progression of colon cancer and if so it aims to understand the underlying mechanism(s).

## **Materiel and methods**

### ***Mice***

Female athymic mice (Swiss-nude), aged 4-5 weeks, were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). The mice were acclimatized for 1-2 weeks before tumour transplantation. Animal housing, handling and all procedures involving mice were performed in accordance with the national animal care guidelines (European Commission directive 86/609/CEE; French decree no. 87-848).

### ***Patient-Derived tumour xenograft models***

CR-IGR-0014P is a colon tumour of a human patient obtained from the Gustave Roussy Institute (Villejuif, France) at the initiative of the Oncodesign Consortium (Julien *et al*, 2012). Tumour fragments were subcutaneously grafted into six-week old female nude mice and the animals were sacrificed when tumours reached approximately a volume of 1000 mm<sup>3</sup>. We performed subcutaneous implantation of a 2 mm<sup>3</sup> fragment in the neck area of experimental female nude mice with the tumours obtained from these sources.

### ***Treatments***

Anti-VEGF monoclonal anti-body bevacizumab (Genentech BioOncology, South San Fransisco, USA) was obtained from the pharmacy at Saint Louis Hospital (Paris, France). It was diluted in PBS 1X (CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> free) and 100 µl/mouse was injected intraperitoneally on a twice a week (Tuesday and Friday) schedule at 5 mg/kg. As control 100 µl/mouse of PBS 1X (CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> free) was also injected intraperitoneally twice a week. As bevacizumab is photosensitive, it was stored in the dark at 4°C. The mice were randomized and treatments started when the volume of tumours reached 100 ± 30 mm<sup>3</sup>. The

size of the tumour was assessed with a caliper (large diameter = D and small diameter = d) to obtain the volume  $V = D \times (d)^2 / 2$ , twice a week.

The mice were subjected to 3 different treatment regimens, each regimen composing of 2 groups (Figure 1):

- AAG (bevacizumab) treatment for 30 days (group A). Group B was the control (n = 6).
- bevacizumab treatment for 50 days (group C) as also bevacizumab for 30 days and 20 subsequent days without treatment (group D)(n = 5).
- bevacizumab treatment for 70 days (group E) and a 70 days treatment with a drug-break period intervening between day 30 and 50 (group F)(n = 5).

It was not possible to maintain a control for the 50D and 70D regimen because of the long duration of the treatment, resulting in volume of the tumour exceeding the limits set by the strict rules of ethics.

### ***Radioimmunology***

We collected peripheral blood samples in heparinized tubes by cardiac puncture from anaesthetized mice (immediately before the mice were sacrificed). Blood was then centrifuged at 2000 rpm during 15 minutes and the plasma collected. Radio-immunometry assays were performed on plasma for VEGF, PlGF and HGF according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc., France).

### ***ELISA***

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was performed on tumour homogenates with VEGF, PlGF, and HIF-1 $\alpha$  and on plasma for SDF-1 $\alpha$  according to the manufacturer's protocol (R&D Systems Inc., France).

### ***Immunofluorescence staining***

The identification of endothelial cells and pericytes of tumour vessels were performed by double immunofluorescence staining. Tumours were OCT embedded and frozen. Frozen specimen were cut into 30  $\mu\text{m}$  sections and were fixed on glass slides for 15 min in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Endothelial cells were labelled with rat anti-CD31 (BD Biosciences, France, 1/50), and pericytes were labelled with rabbit anti-desmin (Thermo Scientific, France, 1/200). Immunofluorescence detection was done using secondary antibodies Alexa Fluor 488-labelled goat anti-rat IgG for anti-CD31 and Alexa Fluor 594-labelled goat anti-rabbit IgG for anti-desmin (Life Technologies, France, 1/400). Tissue sections were examined with an Observer Z1 (Zeiss®) fluorescence microscope. For endothelial cells and pericytes, the ratio of CD31 or Desmin-stained area to total area was calculated.

### ***Solid tumour disaggregation***

Colon CSC was prepared by generating a single-cell suspension from human colon cancer tissues. Tumour tissues were finely cut and minced with scalpel in 5 mL of stem cell medium (SCM). The tissue suspension was further disaggregated by vigorous pipeting. Enzymatic disaggregation was achieved by incubating the tissues for 2h at 37°C with collagenase II (1,5 mg/mL) and DNase I type II (600 U/mL)(Sigma Aldrich, France). Passage through a ficoll column removed necrotic cells, debris and red blood cells. The population of mononuclear cells obtained was then resuspended in 5 mL of SCM and serially filtered by using sterile gauze 100  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  and 40  $\mu\text{m}$  nylon meshes.

### ***Flow Cytometry and Cell-sorting Experiments***

*Quantification of cancer stem cells:* To minimize experimental variability and loss of cell viability, all experiments were performed on fresh tumour cell suspensions prepared before flow cytometry. Antibody staining was performed in PBS 1X containing 1% bovine serum albumin, and 2% fetal bovine serum. Analysis of ALDH enzymatic activity was performed using the Aldefluor system (StemCell Technologies Inc., France) according to the manufacturer's instructions. The cells were subsequently washed and stained with antibodies. Antibodies used in this study included: anti-human CD44-Pacific Blue (Exbio, Clinisciences, France), anti-human CD133-APC (Miltenyi Biotec, France) and anti-human CD166-PE (Beckman Coulter, France). Flow-cytometry analysis was performed by using a MoFlo® Astrios™ cell sorter (Beckman Coulter, France).

*Quantification of endothelial progenitor cells:* Blood samples were freshly collected in heparinized tubes by cardiac puncture from anaesthetized mice (immediately before mice were sacrificed). Following lysis of red blood cells, the peripheral blood mononuclear cells were incubated for 30 min at 4°C with the following antibodies: anti-mouse VEGFR-2-FITC antibody, anti-mouse CD34-PE antibody, anti-mouse anti-CD45.1-FITC antibody, or immunoglobulin G isotype as controls (eBiosciences, Paris, France). The cells were then examined using a BD Biosciences LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The percentage of positive cells in each sample was calculated using Kaluza flow cytometry analysis software (Beckman Coulter France S.A.S, Villepinte, France).

### ***Statistical Analysis***

Results were subjected to statistical analysis using GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad, San Diego, USA). The results are expressed as means ± SEM. Student t-test was applied for the analysis of surface immunofluorescence staining. Statistical significance was determined

by using Mann–Whitney U-test. All statistical tests were two-sided, as the comparison was always done between the group A *versus* the group B, the group C *versus* the group D and the group E *versus* the group F. The p-values  $<0.05$  were considered to be statistically significant.

## **Results**

### ***Kinetics of tumour growth***

The kinetics of tumour growth was followed for the 3 regimen of bevacizumab treatment. For the first regimen, that is, mice receiving 30 days of bevacizumab treatment (group A) we observed a significant delay in tumour growth ( $p < 0.01$ ) compared to the non-treated animals (Fig. 2A). In the second regimen, the discontinuation of bevacizumab (group D) resulted in an acceleration of tumour growth after day 40, with a significance value ( $p < 0.05$ ) at day 50 (Fig. 2B) and could be considered as a rebound effect. In the last regimen, after a drug-break period (group F) in a long-term treatment (70 days), we did not observe any significant difference compared to the continuous 70 days treatment (group E)(Fig. 2C). Taken together, these results indicate that (i) a continuous treatment bevacizumab effectively induces a delay in tumour growth (ii) on the other hand, when bevacizumab was administered on a discontinuous schedule an accelerated tumour re-growth emerged.

### ***Tumour vascularization***

The regression and re-growth of tumour vessels were studied by immunofluorescence staining of endothelial cells (using CD31 as marker) and pericytes (using desmin as marker). The CD31-positive endothelial cells in blood vessels within the tumours were visibly reduced after 30 days of bevacizumab treatment, group A (Fig. 3A) compared to group B (Fig. 3B). After withdrawal of treatment (group D) in the 50D regimen there was a conspicuous increase in tumour vessels displaying both types of cells, endothelial and pericytes. It showed abundant desmin-positive cells completely enveloping the CD31-positive cells (Fig. 3D) as compared to the group C (Fig. 3C). In the 70D regimen (group E), the desmin-positive cells were more abundant than the CD31-positive cells (Fig. 3E). However, in the group F there was a clear increase in CD31-positive cells (Fig. 3F).

After quantification, the regression of tumour vessels caused by VEGF blockade was

observed in every group (A, C and E) receiving continuous treatment (Table 1). In all interrupted groups (D and F), the tumour vessel network was more prominent, with an increase in CD31-positive cells (group D, + 78 % *versus* group C,  $p < 0.01$ ) and (group F, + 35 % *versus* group E,  $p < 0.05$ ), respectively.

The effect of bevacizumab mediated blockade of VEGF on the pericyte population was only observable after the first 30 days. After interruption of treatment (group D) a rebound phenomena was observed with a major increase in the pericyte surface area (+57 % *versus* group C;  $p < 0.05$ ). However, in the prolonged and non-interrupted treatment (group E), contrary to expectations, the pericyte population increased (+46 % *versus* group F;  $p < 0.01$ ). The increase in pericytes under these circumstances may be indicative of a take-over of tumour revascularization.

#### ***Quantification of VEGF, HIF-1 $\alpha$ and other pro-angiogenic factors***

We examined the influence of bevacizumab in our colon human tumour xenograft-bearing model for inducing molecular changes during and after cessation of treatment. We therefore assayed VEGF and PlGF concentrations in tumour and in plasma, for the different treatment regimens. In addition, HGF and HIF-1 $\alpha$  was also assayed in plasma and tumour, respectively. In our model, treatments with bevacizumab down-regulates the VEGF concentration in tumour tissues and in plasma (group A) ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 4A and 4C). The reduction in VEGF concentration remained valid even after a prolonged treatment (groups C and E). It was also associated with a similar reduction in HGF (groups A, C and E) (Fig. 4E). We noticed no difference between the groups for the tumour PlGF levels but however there was a significant difference between the groups C and E (Fig. 4B). In case of all interrupted treatments (groups D and F) the different components such as VEGF, plasmatic PlGF and HGF increased dramatically ( $p < 0.01$ ). The plasmatic VEGF concentration increased

in case of rebound tumour growth (group D) by 81 % ( $79.8 \pm 6.1$  versus  $14.7 \pm 2.9$  pg/mL;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4C). In group F (drug-break period group) the increase was 88 % ( $130.7 \pm 18.3$  versus  $14.9 \pm 3.2$  pg/mL;  $p < 0.01$ ). Moreover, the VEGF concentration in group F was found significantly increased as compared to group D (Fig. 4C). These results indicate that in a second round of treatment, the tumours were able to escape from further effect of bevacizumab exposure.

The effect of the discontinuous schedule of bevacizumab mediated VEGF inhibition on hypoxia was examined by assaying tumour content of HIF-1 $\alpha$  by ELISA. A significant difference was observed only for the 70D regimen, with a 57% decrease of HIF-1 $\alpha$  in the group F (drug-break period) compared to the group E (70 days continuous treatment). The HIF-1 $\alpha$  concentration for the group F was  $526.6 \pm 219.2$  versus  $1241.6 \pm 86.5$  pg/mg of proteins for group E ( $p < 0.05$ ). Contrary to an expected increase of HIF-1 $\alpha$  we observed in fact a significant decrease of this protein in all the 3 groups treated without interruption (A, C and E). The decrease obtained between group A and group C was 46 % while between A and E was 51 % (Fig. 4F). These results are interesting in that the decrease of HIF-1 $\alpha$  and the increase in pro-angiogenic factors (VEGF, PlGF and HGF) seems to be interlinked.

### ***Endothelial progenitors***

We quantified circulating EPCs by flow-cytometry and assayed in plasma the stromal derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), its downstream effector (Cerradini *et al*, 2004) by ELISA. We observed no significant differences in EPCs and SDF-1 $\alpha$  in the 3 regimens of treatment of our mice model (Fig. 5A and 5B).

### ***Cancer stem cells***

We examined whether our 3 different regimens were able to bring about phenotypic changes by increasing colon CSCs population. We checked subpopulation markers with ALDH1 $^+$ ,

CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup> and with ALDH1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>. In the 30D treatment regimen, the use of bevacizumab did not change the level of CSCs in tumours. In the groups with interruption of bevacizumab treatment we observed, for the 2 subpopulations, an increase in CSCs (group D and F) (Fig. 5C and 5D). In the case of ALDH1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> cells the tumour CSC levels increased dramatically ( $p < 0.01$ ) with a 57 % increase in group D and a highly significant increase of 90 % ( $7.99 \pm 5.1$  versus  $0.67 \pm 0.34$  cells %;  $p < 0.01$ ) for the group F (Fig. 5D). It was clear that the interruption of bevacizumab treatment affected the size of CSC population in tumours.

## Discussion

The VEGF antagonist bevacizumab is of interest in treatment of CRC and is largely used by clinicians world-wide. There was a great optimism that inhibition of the VEGF pathway would represent an effective AAG therapy. VEGF pathway-targeted drugs have shown initial clinical benefits but however in the vast majority of patients the disease was ultimately found to progress and was therefore disappointing in the long run.

In practice, treatment may be subjected to interruption and then to a restart (drug-break period) or to abandon *en route*. In these cases, patient benefits should be clearly evaluated. Clinical observations in some patients treated with AAG revealed rapid regrowth and revascularization during the drug-break period or drug withdrawal (Cacheux *et al*, 2008; Griffioen *et al*, 2012). The therapeutic and mechanistic relevance of this regrowth and revascularization are still unclear.

The reason we chose the PDX model, compared to the human CRC cell-line derived xenograft model, is that the former is more representative of the heterogeneity of human cancers in terms of clinical parameters, histopathology, molecular pattern, and sensitivity to drugs (Julien *et al*, 2012).

This study focuses on the effects of a discontinuous or drug-break period of VEGF inhibition and uses a PDX CRC mouse model for the purpose. First, we followed the kinetics of tumour growth. The 30D regimen confirmed the efficiency of bevacizumab in inhibiting tumour growth. Our results showing that stopping VEGF inhibition (50D regimen) led to a rapid and significant regrowth as observed by Cacheux *et al*. Our findings are consistent with the notion of a *rebound* following interruption of angiogenesis inhibition. Cacheux *et al*. (Cacheux *et al*, 2008) has also reported that bevacizumab re-induced a tumour response on resumption of treatment of their patients. We have not been able to confirm their claims however interesting.

We also examined the tumour revascularization in the 3 anti-VEGF regimens; the goal was 1) to determine the rate of blood vessel re-growth in tumours after removal of VEGF inhibition and 2) the role of endothelial cells and pericytes in this revascularization. First, we noticed that an anti-VEGF treatment without interruption always prevented the formation of new tumour vessels originating from CD31-positive cells. After withdrawal of bevacizumab (50D regimen) a conspicuous increase in the number of tumour blood vessels, composed of endothelial cells and pericytes, was observed. Also an abundant number of desmin-positive cells were found to completely cover the CD31-positive cell population. This strongly suggest that the withdrawal of VEGF inhibition induces the acceleration of tumour blood vessel re-growth. The study of Mancuso *et al.* (Mancuso *et al.*, 2006) has addressed the issue of revascularization on spontaneous pancreatic islet cell carcinomas in RIP-Tag2 mice treated for 7 days with an inhibitor of VEGFR. They found that after the withdrawal of treatment ultimately led to full vascularization of implanted tumours.

CD31-positive cells were significantly lower in the continuous bevacizumab treatment group (70 days) compared to the drug-break group. This observation indicates that continuous anti-VEGF treatment resulted in the loss of CD31-positive cells (endothelial). Concomitantly, the reduction in CD31-positive cells led to a significant increase in desmin-positive cells (pericytes), indicating that perhaps they are able to function in a compensatory manner and take-over the revascularization of tumours. However, after a drug-break period, we observed a significant decrease of desmin-positive cells on one hand and a simultaneous increase in CD31-positive cells indicating that a second round of bevacizumab did not prevent a revascularization and “tumour escape”. Surprisingly, Mancuso *et al.* (Mancuso *et al.*, 2006) found that a second round of anti-VEGFR reduced tumour vascularity as much as the first round which was in contradiction with the results obtained by us which may be due to differences in the protocol and experimental design adopted by the two groups.

Indeed, in our case the longer duration of treatment may have been the cause for triggering a higher level of resistance. The differences in response to treatment may also be due to the difference in the type of tumours: human colon *versus* murine pancreatic carcinomas or it could come from the difference in the drugs used: we used anti-VEGF while Mancuso *et al.* (Mancuso *et al*, 2006) used an anti-VEGFR. The increase in VEGF in the 50D regimen after halt in treatment (group D) correlated well with the recruitment of endothelial CD31-positive cells. There was also an increase in VEGF in the plasma compared to group C. Even though, no difference was found for the intra-tumour VEGF in the 50D regimen, there was a remarkable increase of VEGF in the plasma as well as within the tumour in case of the 70D regimen. This observation supports well the finding that the re-growth tumour vasculature involves endothelial cells in group F. It is clear that much of the re-grown tumour blood vessels originated from bevacizumab-resistant cells.

This is the first study that examines the effect of a long and protracted treatment by bevacizumab. We can conclude that in the 2 cases (non-interrupted treatment *versus* drug-break period) a clear resistance to bevacizumab was observed. It is likely that when VEGF was inhibited by bevacizumab, the signal responsible for endothelial cell activation “switched off” and consequently the pericytes took over and revascularized the tumours. We know that VEGF has no effect on pericytes recruitment but we also know that pericytes participate in the maturation of blood vessels (Benjamin *et al*, 1998). The presence of pericytes is a sign of vessel maturation and therefore is certainly the consequence of resistance to the anti-angiogenics. Our findings indicate that tumour blood vessels undergo rapid regression when VEGF is inhibited. Our results also underline the importance of pericytes, besides CD31-positive cells, as potential targets in cancer therapy. There are ongoing clinical trials or trials in development that aim to target simultaneously endothelial cells and pericytes and assess the potential benefits for efficient anti-tumour therapy.

Besides VEGF we also turned our attention to two other pro-angiogenic factors namely PlGF and HGF. We studied PlGF from intra-tumoural regions and from plasma, and HGF from plasma. Again the 3 different regimens of treatment, as in the case of VEGF, were employed in order to determine whether bevacizumab was able to induce discernable changes in the behavior of PlGF and HGF. The PlGF assay in intra-tumour indicated no difference among the 3 regimens. However, a significant difference between the group C and the group E was seen indicating that the duration of bevacizumab exposure had an obvious effect in the activation of these pro-angiogenic growth factors. In the group with discontinuation of treatment (group D), the plasma assay for HGF and PlGF showed a significant up-regulation as also in the 70D regimen after a drug-break period (group F). The modulation of these 2 pro-angiogenic factors under the experimental conditions indicates that in the absence of VEGF alternate pathways could intervene in the process of tumorigenesis. Such compensatory pathway activation after an AAG treatment has been already documented by several authors (Casanovas *et al*, 2005; Fan *et al*, 2011; Yamagishi *et al*, 2013). The present study has revealed that a discontinuous, as compared to the continuous schedule of bevacizumab, induced an increase in pro-angiogenic factors including PlGF and HGF involved in the development of resistance.

However, the concept that the activation and/or up-regulation of alternative pro-angiogenic signaling pathways mediate resistance to AAG therapy is yet to be clinically validated. The majority of tyrosine kinase inhibitors used to treat patients (including brivanib, cediranib, dovitinib, sunitinib, sorafenib, vatalanib and many others) are multi-target in nature and can suppress the signaling of several pro-angiogenic pathways. The diseases such as glioblastoma (Batchelor *et al*, 2013), hepatocellular carcinoma (Johnson *et al*, 2013) and metastatic renal cell carcinoma (Motzer *et al*, 2014) have been shown to progress in spite of treatment with these agents. This contrasts with the preclinical studies demonstrating a role for alternative

signaling pathways and questions the relevance of alternative pro-angiogenic growth factors in mediating resistance to AAG therapy in patients (Vasudev & Reynolds, 2014). In case one encounters resistance to AAG it would be interesting, in a second round of treatment, to test another pro-angiogenic target. It should ultimately permit in establishing an effective therapeutic strategy that could be tested in the clinics.

Hypoxia is one of the major condition, in which HIF-1 $\alpha$ , that partly through SDF-1 $\alpha$ , is involved in the recruitment of bone marrow-derived cells such as EPCs for tumour growth (Ceradini *et al*, 2004). These EPCs have the capacity to differentiate into mature endothelial cells and to participate in the formation of new tumour blood vessels (Asahara *et al*, 1997; Du *et al*, 2008). We presume that circulating EPCs may be involved in the rebound tumour growth observed in our PDX colon cancer model. However, to our surprise, we noticed no significant differences in the circulating EPC levels between the different groups in our 3 regimens. Apparently, the EPCs seem not to be involved in the acceleration of tumour revascularization after discontinuation of bevacizumab.

The CSCs have been isolated from a variety of tumour types, including CRC. Most anti-cancer therapies are believed not to target CSCs and therefore these cells are spared and survive even after drug administration. These CSCs may play a role in cancer recurrence (Todaro *et al*, 2010). The recurrent tumour growth, observed in patients treated with AAG, raised the question as to whether there exists a subpopulation of cells in colon cancer responsible for the resistance to AAG. A preclinical study has shown that by inducing hypoxia, the anti-angiogenesis therapies also increased the ALDH<sup>+</sup> CSC in human breast cancer xenografts (Conley *et al*, 2012). A recent report has described that the CD133<sup>+</sup>CSC population in colon cancer was resistant to bevacizumab (Lin *et al*, 2013) which further support that these cells survive the drug treatment and therefore could be a source of repopulation of the tumour.

Using a panel of markers that are known to be present on CSCs of human CRC (Dalerba *et al*, 2007) we quantified by flow cytometry, two types of CSC subpopulations in the 3 regimens. We demonstrate here that a discontinuous schedule of bevacizumab modifies the expression profile of CRC xenografts by significantly increasing CSCs. In view of these findings we may consider other mechanisms that may intervene in evasive resistance through stimulation and enrichment of the two types of subpopulations. Studying the level of HIF-1 $\alpha$  may provide further information.

A significant decrease in HIF-1 $\alpha$  between the groups A and C as also between the groups A and E was noticed. This may be due to the fact that after initial AAG treatment the intratumoural hypoxia increases in the first regimen (30D). In the 50D and 70D regimen the increase in pro-angiogenic factors (VEGF, PlGF and HGF) on one hand and the tumoural revascularization on the other may explain the decrease in HIF-1 $\alpha$ . The increase in the pro-angiogenic factors, in case of discontinuous schedules (group D and group F), raised the question about the hypoxia-mediated stimulation of CSCs.

There are in fact preclinical and clinical trials that test whether HIF-1 $\alpha$  blockade could increase the therapeutic benefits of inhibitors of VEGF signaling. The association of an AAG and topotecan (a topoisomerase I inhibitor that blocks the accumulation of HIF-1 $\alpha$ ) has already been tested on a glioblastoma (Rapisarda *et al*, 2009) and on an ovarian cancer animal models (Hashimoto *et al*, 2010). In both cases they have been found to display an increased anti-tumour activity. Unfortunately, the study in which the topotecan has been tested in combination with bevacizumab in patients with refractory solid tumours was halted prematurely (Jeong *et al*, 2014).

We have seen from our studies that in both cases (uninterrupted *versus* interrupted treatment) the tumours may show resistance to AAG but the discontinuous schedule is the worst-case

scenario. A very recent paper describes a specific clinical situation, named maintenance strategy that underlines the importance of non-stopping AAG treatment on a metastatic CRC strategy (Simkens *et al*, 2015). Our results certainly throw some light on the events involved and attempt to provide an explanation. Clinical experience provides proof-of-principle that AAG therapy is a valid therapeutic approach but the full potential of this strategy, however remains yet to be completely exploited.

Finally, this study has emphasized the fact that a discontinued schedule of bevacizumab modifies the tumour cell heterogeneity as a result of rebound and repopulation. Any successful future development of AAG therapy will require further understanding of how this tumour heterogeneity occurs and how to target it effectively. It is a key goal, not just for AAG therapy, but for all cancer therapeutics. Our findings showing that a discontinuous schedule of bevacizumab led to an increase in CSCs provide a potential explanation for the limited clinical benefits from AAG therapies as of today. Improving the clinical efficacy of AAG treatments will require developing therapeutics that target these resistant CSC population.

### ***Acknowledgments***

We thank Nathalie JOURDAN DESRAYAUD and Géraldine MICHEL (pharmacist at the Saint-Louis hospital) from the departments of preparation unit anticancer for having delivered us bevacizumab. Selma Becherirat has obtained a ministerial scholarship from Paris-Diderot University for this project. This work has also been supported by a grant from Fondation de l'avenir and Fondation de France.

***Conflict of interest:*** the authors declare no conflict of interest.

## Bibliography

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964–967.
- Batchelor TT, Gerstner ER, Emblem KE, Duda DG, Kalpathy-Cramer J, Snuderl M, Ancukiewicz M, Polaskova P, Pinho MC, Jennings D, Plotkin SR, Chi AS, Eichler AF, Dietrich J, Hochberg FH, Lu-Emerson C, Iafrate AJ, Ivy SP, Rosen BR, Loeffler JS, Wen PY, Sorensen AG, Jain RK (2013) Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 19059–19064.
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Dev Camb Engl* **125**: 1591–1598.
- Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, von Moos R, Viéitez JM, Bouché O, Borg C, Steffens C-C, Alonso-Orduña V, Schlichting C, Reyes-Rivera I, Bendahmane B, André T, Kubicka S, ML18147 Study Investigators (2013) Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **14**: 29–37.
- Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**: 592–603.
- Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Wolff AC, Eisenberg PD, Lehman M, Adams BJ, Bello CL, DePrimo SE, Baum CM, Miller KD (2008) Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **26**: 1810–1816.
- Cacheux W, Boisserie T, Staudacher L, Vignaux O, Dousset B, Soubrane O, Terris B, Mateus C, Chaussade S, Goldwasser F (2008) Reversible tumor growth acceleration following bevacizumab interruption in metastatic colorectal cancer patients scheduled for surgery. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* **19**: 1659–1661.
- Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **8**: 299–309.
- Cascone T, Herynk MH, Xu L, Du Z, Kadara H, Nilsson MB, Oborn CJ, Park Y-Y, Erez B, Jacoby JJ, Lee J-S, Lin HY, Ciardiello F, Herbst RS, Langley RR, Heymach JV (2011) Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* **121**: 1313–1328.

- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* **10**: 858–864.
- Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG, Wicha MS (2012) Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 2784–2789.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10158–10163.
- Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G (2008) HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **13**: 206–220.
- Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS (2009a) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **15**: 232–239.
- Ebos JML, Lee CR, Kerbel RS (2009b) Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **15**: 5020–5025.
- Ellis LM, Hicklin DJ (2008) Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **14**: 6371–6375.
- Fan F, Samuel S, Gaur P, Lu J, Dallas NA, Xia L, Bose D, Ramachandran V, Ellis LM (2011) Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. *Br J Cancer* **104**: 1270–1277.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen J-M, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P (2007) Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* **131**: 463–475.
- Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P (2008) FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* **8**: 942–956.
- Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D’Emidio S, Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nictolis M, Cappuzzo F, Magnani M (2011) Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **29**: 4789–4795.

- Griffioen AW, Mans LA, de Graaf AMA, Nowak-Sliwinska P, de Hoog CLMM, de Jong TAM, Vyth-Dreese FA, van Beijnum JR, Bex A, Jonasch E (2012) Rapid angiogenesis onset after discontinuation of sunitinib treatment of renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **18**: 3961–3971.
- Hashimoto K, Man S, Xu P, Cruz-Munoz W, Tang T, Kumar R, Kerbel RS (2010) Potent preclinical impact of metronomic low-dose oral topotecan combined with the antiangiogenic drug pazopanib for the treatment of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* **9**: 996–1006.
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN (2009) The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle Georget Tex* **8**: 3274–3284.
- Hirota K, Semenza GL (2006) Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* **59**: 15–26.
- 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.
- Jeong W, Park SR, Rapisarda A, Fer N, Kinders RJ, Chen A, Melillo G, Turkbey B, Steinberg SM, Choyke P, Doroshow JH, Kummar S (2014) Weekly EZN-2208 (PEGylated SN-38) in combination with bevacizumab in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs* **32**: 340–346.
- Johannsen M, Flörcken A, Bex A, Roigas J, Cosentino M, Ficarra V, Kloeters C, Rief M, Rogalla P, Miller K, Grünwald V (2009) Can tyrosine kinase inhibitors be discontinued in patients with metastatic renal cell carcinoma and a complete response to treatment? A multicentre, retrospective analysis. *Eur Urol* **55**: 1430–1438.
- Johnson PJ, Qin S, Park J-W, Poon RTP, Raoul J-L, Philip PA, Hsu C-H, Hu T-H, Heo J, Xu J, Lu L, Chao Y, Boucher E, Han K-H, Paik S-W, Robles-Aviña J, Kudo M, Yan L, Sobhonslidsuk A, Komov D, Decaens T, Tak W-Y, Jeng L-B, Liu D, Ezzeddine R, Walters I, Cheng A-L (2013) Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **31**: 3517–3524.
- Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goéré D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P, Weiswald L-B, Lantuas D, Morgand L, Pham E, Gonin P, Dangles-Marie V, Job B, Dessen P, Bruno A, Pierré A, De Thé H, Soliman H, Nunes M, Lardier G, Calvet L, Demers B, Prévost G, Vrignaud P, Roman-Roman S, Duchamp O, Berthet C (2012) Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **18**: 5314–5328.
- Kim Y-J, Lee H-J, Kim T-M, Eisinger-Mathason TSK, Zhang AY, Schmidt B, Karl DL, Nakazawa MS, Park PJ, Simon MC, Yoon SS (2013) Overcoming evasive resistance from vascular endothelial growth factor a inhibition in sarcomas by genetic or

- pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Int J Cancer J Int Cancer* **132**: 29–41.
- Lin S-P, Lee Y-T, Yang S-H, Miller SA, Chiou S-H, Hung M-C, Hung S-C (2013) Colon cancer stem cells resist antiangiogenesis therapy-induced apoptosis. *Cancer Lett* **328**: 226–234.
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freemark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM (2006) Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* **116**: 2610–2621.
- Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW (2005) Can tumor angiogenesis be inhibited without resistance? *EXS* 95–112.
- Motzer RJ, Porta C, Vogelzang NJ, Sternberg CN, Szczylik C, Zolnierok J, Kollmannsberger C, Rha SY, Bjarnason GA, Melichar B, De Giorgi U, Grünwald V, Davis ID, Lee J-L, Esteban E, Urbanowitz G, Cai C, Squires M, Marker M, Shi MM, Escudier B (2014) Dovitinib versus sorafenib for third-line targeted treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**: 286–296.
- Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **15**: 220–231.
- Peruzzi B, Bottaro DP (2006) Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **12**: 3657–3660.
- Rapisarda A, Hollingshead M, Uranchimeg B, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Gehrs B, Raffeld M, Kinders RJ, Parchment R, Anver MR, Shoemaker RH, Melillo G (2009) Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol Cancer Ther* **8**: 1867–1877.
- Rapisarda A, Melillo G (2009) Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* **12**: 74–80.
- Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, Feng J, Stewart AE, Hu-Lowe DD, Christensen JG (2010) HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res* **70**: 10090–10100.
- Simkens LHJ, van Tinteren H, May A, ten Tije AJ, Creemers G-JM, Loosveld OJL, de Jongh FE, Erdkamp FLG, Erjavec Z, van der Torren AME, Tol J, Braun HJJ, Nieboer P, van der Hoeven JJM, Haasjes JG, Jansen RLH, Wals J, Cats A, Derleyn VA, Honkoop AH, Mol L, Punt CJA, Koopman M (2015) Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (CAIRO3): a phase 3 randomised controlled trial of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Lancet Lond Engl* **385**: 1843–1852.

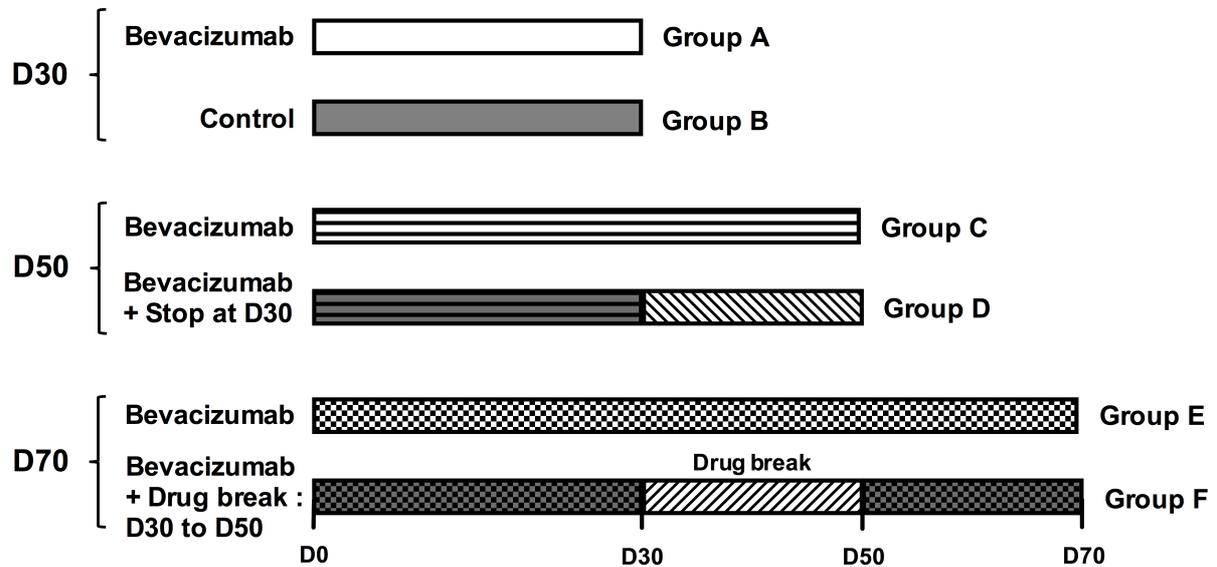
- Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Ahmad SA, Jung YD, Fan F, Ellis LM (2003) Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol* **10**: 722–733.
- Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G (2010) Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* **138**: 2151–2162.
- Vasudev NS, Reynolds AR (2014) Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* **17**: 471–494.
- Welti JC, Gourlaouen M, Powles T, Kudahetti SC, Wilson P, Berney DM, Reynolds AR (2011) Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib. *Oncogene* **30**: 1183–1193.
- Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, Dang LH, Nikawa T, Rokutan K (2013) Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer* **13**: 229.

## Table legends

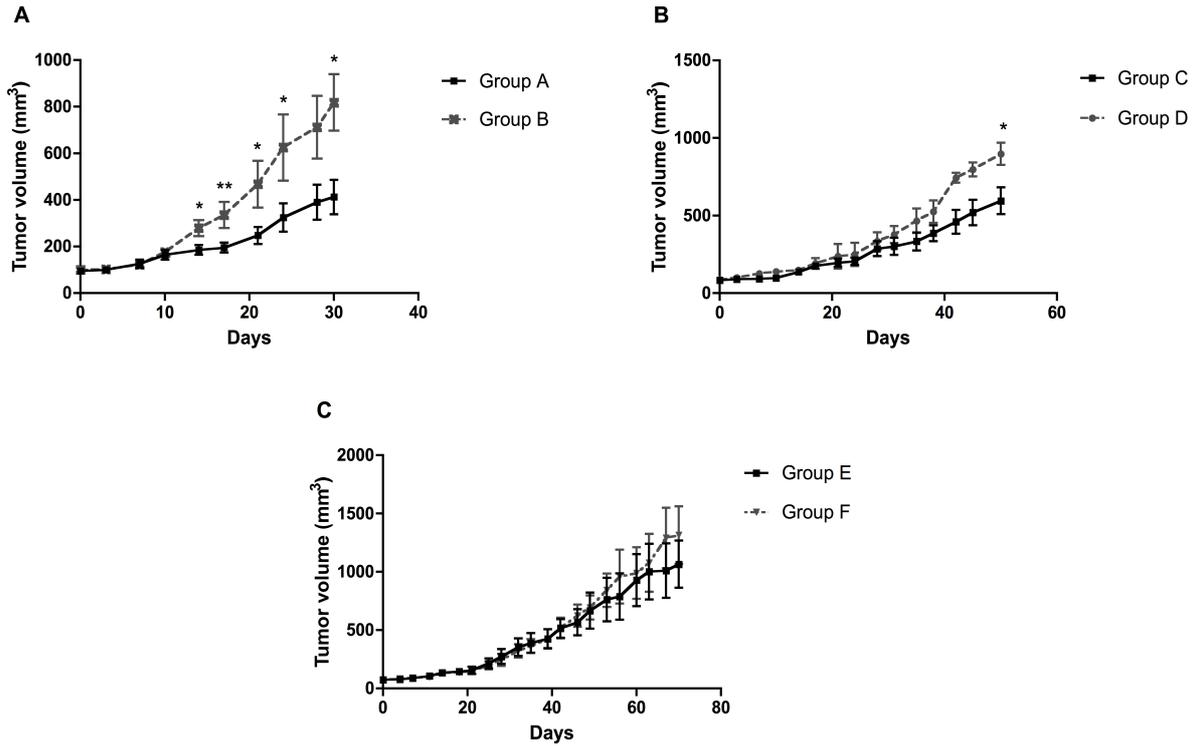
D 30			
Surface expression	Group A	Group B	p
Surface CD31/ total surface (%)	1.83±1.84	5.14±4.8	p<0.01
Surface Desmine/ total surface (%)	1.25±1.36	1.50±1.49	NS
D50			
Surface expression	Group C	Group D	p
Surface CD31/ total surface (%)	1.15±1.13	5.42±5.8	p<0.01
Surface Desmine/ total surface (%)	4.2±2.97	10.15±8.32	p<0.05
D70			
Surface expression	Group E	Group F	p
Surface CD31/ total surface (%)	1.14±1.22	1.77±1.0	p<0.05
Surface Desmine/ total surface (%)	4.23±2.12	2.27±1.45	p<0.01

**Table 1. Measurements showing the surface of CD31-positive cells and desmin-positive cells in blood vessels in the 3 different regimens.** In the D30 regimen there is a significant decrease of vascularity in the group A, confirming the efficacy of this anti-angiogenic to prevent the formation of new tumour vessels and at the same time eliminate existing tumour vessels. In the D50 regimen, after withdrawal of bevacizumab (group D), vascular density increased significantly with significant increase of CD31 and desmin-positive cells. It indicates an acceleration of the tumour re-growth. In the D70 regimen, there is also a significant increase of CD31-positive cells (group F) indicating that after a second round of bevacizumab the re-grown tumour vessels are resistant to the anti-angiogenics. Instead in the non-interrupted group the number of desmin-positive cells increased significantly (group E) indicating their ability to take over in place of CD31 in the tumour revascularization. Data is presented as mean ± SEM. p-values <0.05 were considered to be statistically significant.

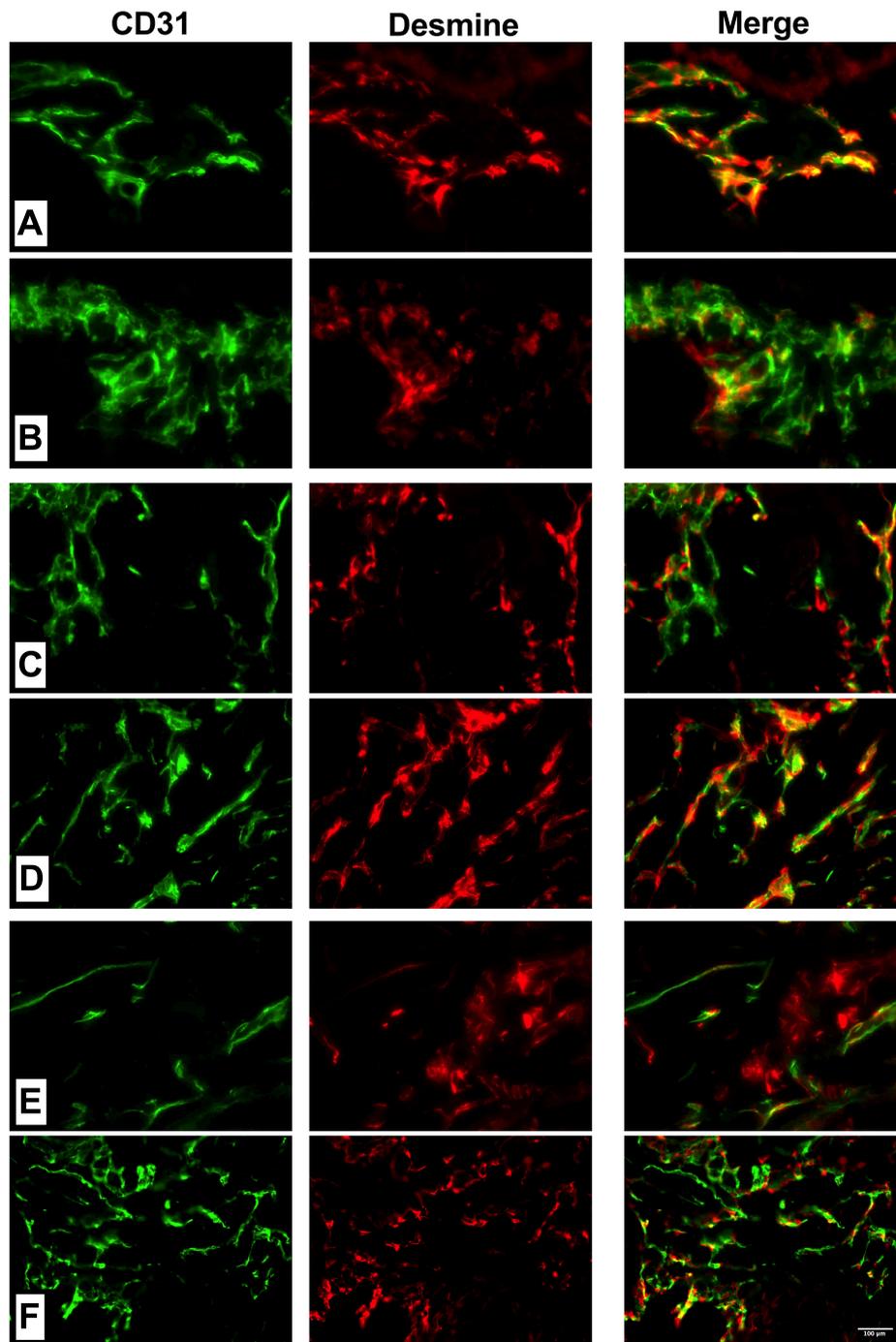
## Figure legends



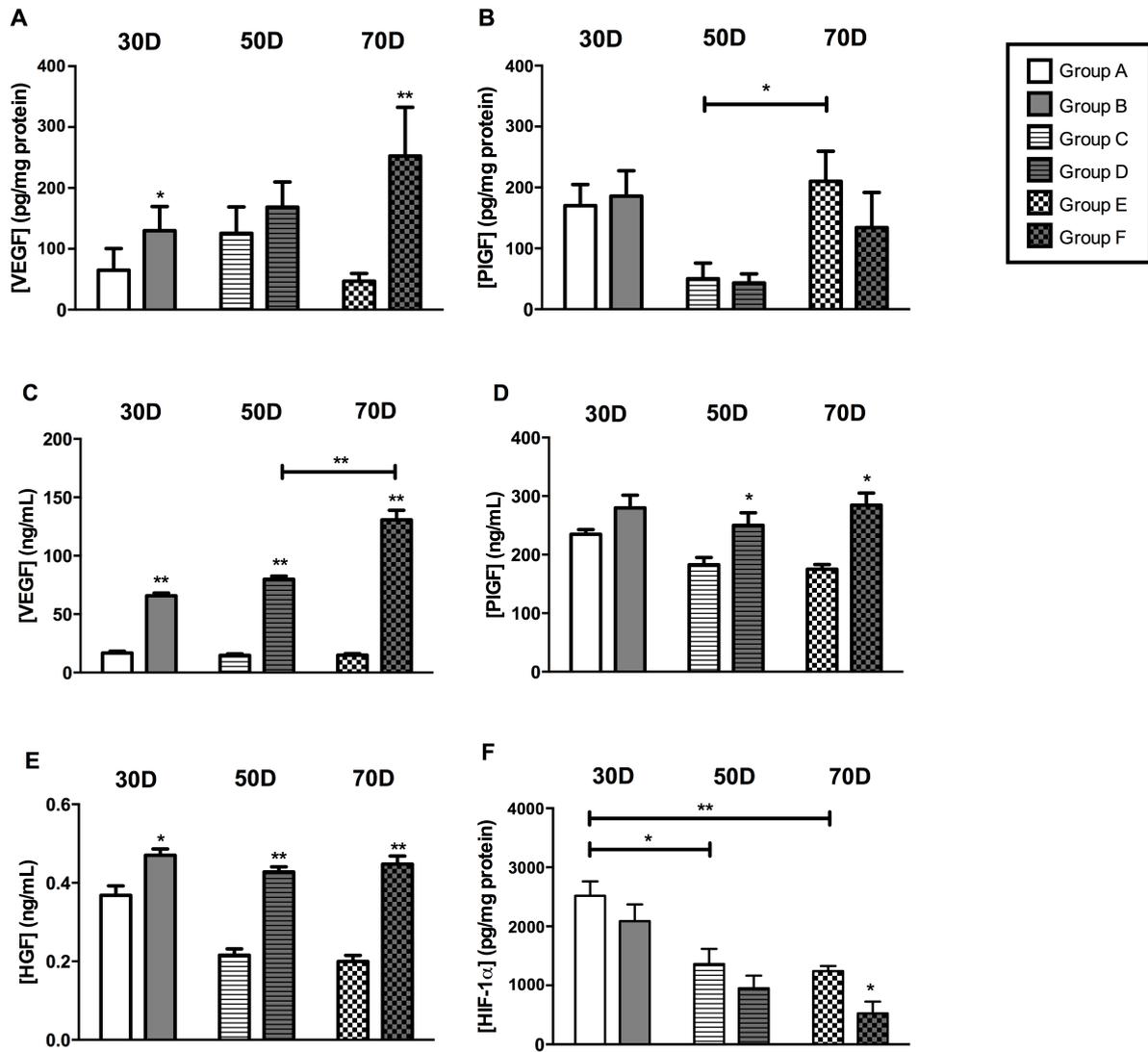
**Figure 20. Treatment regimen.** The mice were treated with 3 different regimens to analyze the effect of a discontinuous therapy with bevacizumab. The first regimen (D30) was composed of 6 mice per group. The group A was treated 30 days with bevacizumab *versus* the non-treated control, group B. The second regimen (D50) was composed of 5 mice per group. The group C was treated for 50 days continuously with bevacizumab *versus* the group D treated for 30 days and 20 subsequent days without treatment. The third regimen (D70) was composed of 5 mice per group. The group E was treated 70 days continuously with bevacizumab *versus* the group F treated for 70 days with a drug-break period from day 30 to day 50.



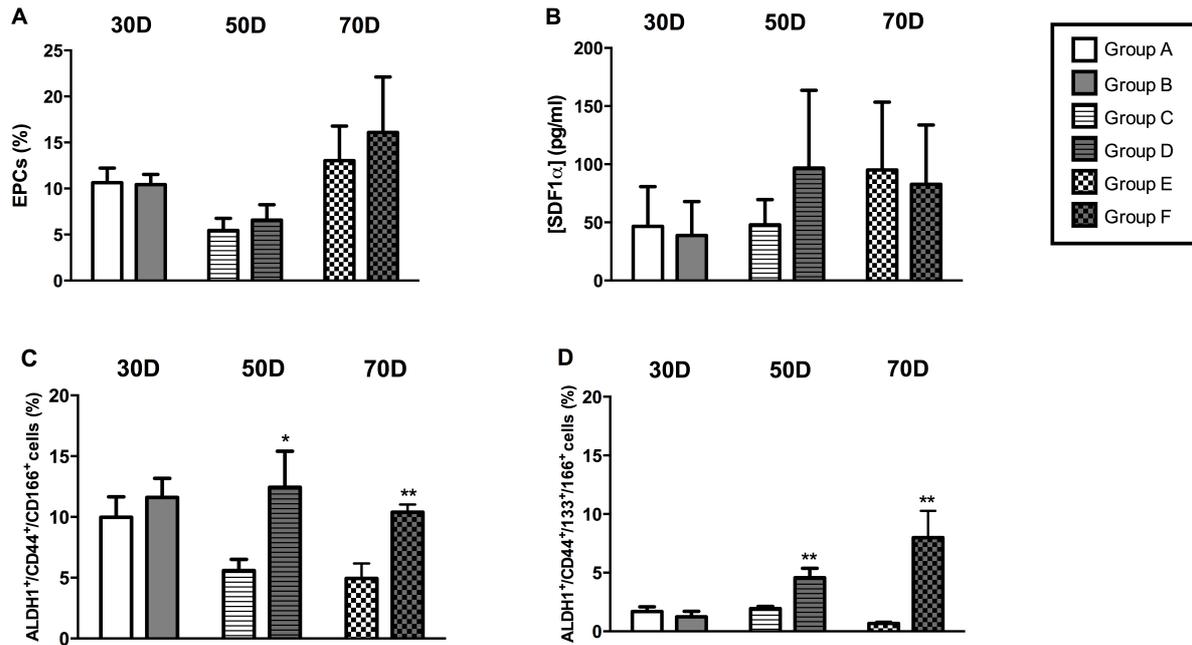
**Figure 2. Kinetics of tumour growth on colon PDX tumour treated with a discontinuous schedule of bevacizumab.** (A) Bevacizumab administered 30 days (Group A) induced a significant delay in tumour growth compared to non-treated control (Group B). (B) Bevacizumab discontinued at day 30 (group D) induced a rapid resumption of tumour growth as compared to group C. (C) When bevacizumab was stopped at day 30 (group F) there was a slight but notable resumption of tumour growth which was not restored after re-challenge at day 50 compared to Group E, treated 70 days uninterrupted. Data is presented as mean  $\pm$  SEM.  $0.01 < *p < 0.05$ ;  $0.001 < **p < 0.01$ .



**Figure 3. Fluorescence microscopic images of tumours stained for CD31 (green; endothelial cells) and desmin (red; pericytes).** The staining with CD31 (A) showed a regression after bevacizumab for 30 days compared to the non-treated tumours (B) there are no obvious differences in expression of desmin in the 2 groups. (C) When treatment was maintained for 50 days the vascularization was still held in check. (D) But when the treatment was stopped the tumours became highly revascularized by CD31 and desmin-positive cells. (E) With a prolonged bevacizumab treatment of 70 days the pericytes (desmin-positive cells) are alone able to revascularize the tumours. (F) In group F a second round of treatment does not prevent revascularization by CD31-positive cells. Scale bar (applies to all images): 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4. Discontinuation of bevacizumab induces activation of alternative pro-angiogenic pathways.** In order to understand the mechanisms of evasive resistance, including revascularization as a result of up-regulation of alternative pro-angiogenic signals, we analyzed molecular changes of VEGF, PlGF, HGF and HIF-1 $\alpha$  in our 3 regimens. (A and B) Intra-tumour assay by ELISA. The concentration is expressed in pg/mg of proteins (pg/mg protein). (A) VEGF (B) PlGF (C, D and E) Plasma assay by radioimmunity. The concentration is expressed in ng/mL. (C) VEGF (D) PlGF (E) HGF. (F) HIF-1 $\alpha$ ; also intra-tumour assay by ELISA expressed in pg/mg protein. Data is presented as mean  $\pm$  SEM.  $0.01 < *p < 0.05$ ;  $0.001 < **p < 0.01$ .



**Figure 5. Discontinuous bevacizumab treatments do not modify EPC recruitment by SDF-1 $\alpha$  but induces enrichment of CSCs.** (A) The quantification by flow cytometry shows no differences between the groups in EPCs recruitments. (B) The SDF-1 $\alpha$  assay also showed no difference between these groups. The assay concentration is expressed in pg/mL. We quantified, by flow cytometry, 2 types of CSC subpopulations, with ALDH1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup> and ALDH1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> cell markers, respectively (C) In the first regimen there was no difference between the different groups but when bevacizumab was stopped (group D) there was a significant increase of CSCs, and the same result was observed after a drug-break period (group F) with a significant increase compared to the group E. (D) As for the first subpopulation, there was no difference between the different groups for the D30 regimen. After withdrawal of bevacizumab (group D) there was a significant increase of the CSCs as in the case of the drug-break period (group F). Data is presented as mean  $\pm$  SEM.  $0.01 < *p < 0.05$ ;  $0.001 < **p < 0.01$ .

## Partie II

### Contexte scientifique et objectif

L'association de bevacizumab à une chimiothérapie permet d'allonger significativement la survie des patients atteints de CCRM. Il semblait donc logique d'évaluer en situation adjuvante dans le cancer du côlon, le bevacizumab, en association avec la chimiothérapie standard. Deux études ont évalué le bevacizumab. Dans l'essai C-08 les patients ont été traités au FOLFOX6 (5-FU + Oxaliplatine + leucovorin) avec ou sans bevacizumab pendant 6 mois, suivi de 6 mois de traitement d'entretien au bevacizumab (Allegra et al. 2011). Pour l'essai AVANT, le design est proche ; FOLFOX6 ou XELOX (capécitabine + oxaliplatine) avec ou sans bevacizumab pendant 6 mois, suivi de 6 mois de traitement d'entretien au bevacizumab (de Gramont et al. 2012). La SSP à trois ans, objectif principal de ces deux essais, n'a pas été améliorée (HR, respectivement, de 0,89 ; 1,17 et 1,07 ;  $p$  non significatif). Alors que les données de l'essai C-08 suggéraient un effet bénéfique transitoire du bevacizumab, aucune tendance de ce type n'a été observée dans l'essai AVANT ; au contraire les données de la SG montreraient un effet délétère du bevacizumab. La SG a en effet été significativement diminuée dans cette étude par rapport à la chimiothérapie seule.

Les 2 études ont rassemblé environ 6000 patients, pour n'en tirer aucun bénéfice. Cette association thérapeutique n'avait pas été au préalable testée en préclinique, ce qui justifie pleinement le fait de vouloir explorer cette problématique et essayer de comprendre pourquoi le traitement n'a pas été efficace. Une fois de plus, après l'irinotécan un traitement ayant montré son efficacité en situation métastatique ne le montre pas en situation adjuvante.

Dans une étude préclinique la même observation est faite. Sur un modèle murin de cancer mammaire, les auteurs ont testé le sunitinib en adjuvant. Ils ont observé une augmentation de métastases et une diminution de la SG des souris traitées au sunitinib par rapport au contrôle (Ebos et al. 2009). Avec plus de 200 études cliniques en cours testant l'efficacité des AAG en traitement adjuvant dans différents cancers, une étude rigoureuse doit être conduite sur des modèles précliniques mimant aux mieux la maladie humaine afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la non-efficacité des thérapies AAG utilisées comme adjuvant. Ces mesures permettront de ne pas refaire des erreurs identiques qui peuvent être délétères pour les patients et qui peuvent conduire à abandonner des pistes thérapeutiques potentielles par manque de stratégie.

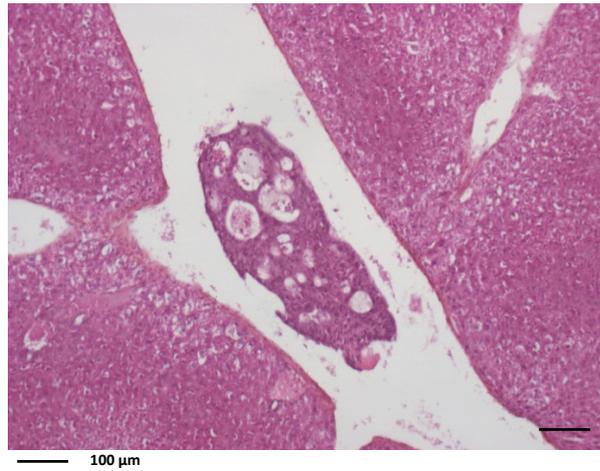
L'objectif de ce projet était dans un premier temps de développer un modèle animal mimant aux mieux la maladie de CCR. Pour cela, des souris ont eu une xéno greffe orthotopique (en intra-caecal) dérivée de prélèvements de tumeurs coliques de patients. Les tumeurs ont ensuite été réséquées 14 jours après greffe, et les souris ont été suivies pendant 3 mois. Ce modèle a été réalisé avec trois types de tumeurs représentatives de l'hétérogénéité tumorale (sensible ou non à la chimiothérapie et de phénotypes moléculaires différents) que nous avons choisies *via* le projet R&D collaboratif CReMEC (Julien et al. 2012). A 3 mois post-résection, les souris présentaient des récurrences tumorales, des nodules de carcinose ainsi que des micro-métastases hépatiques (2 cas) (Tableau 2 et figure 20). Nous avons également dosé un marqueur tumoral plasmatique : l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) qui était augmenté chez les animaux greffés contrairement aux souris contrôles (Figure 21). De plus, nous avons observé 3 phénotypes tumoraux différents en corrélation avec le niveau d'ACE. En effet, le profil le plus agressif correspondait aux taux d'ACE le plus élevé et le profil non-agressif (avec aucune rechute) au taux d'ACE le plus bas. Un profil intermédiaire a également été observé. L'ensemble de ces résultats indique que même après résection de la tumeur le cancer est toujours présent. Ceci nous a permis de valider un modèle murin pertinent de CCR.

Par ailleurs, nous avons choisi de développer un modèle animal xéno greffé de tumeurs coliques dérivées de patients, plutôt que d'utiliser une lignée cellulaire tumorale. En effet, les tumeurs dérivées de patients sont plus représentatives de l'hétérogénéité des cancers humains en termes moléculaires, histo-pathologiques et surtout de sensibilité aux traitements (Julien et al. 2012).

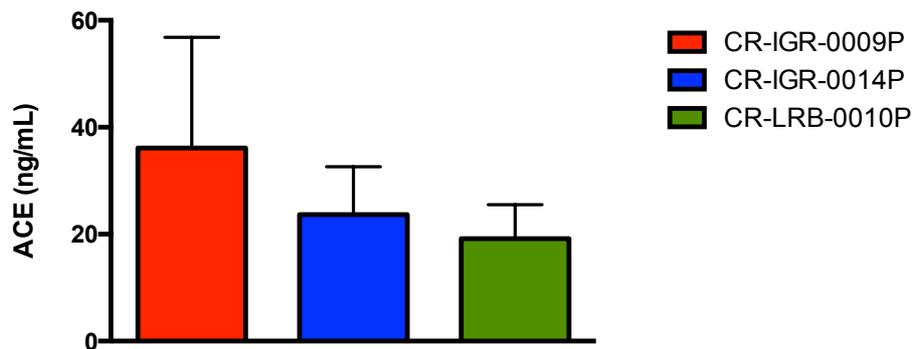
Ceci a fait l'objet d'une revue (cf. article 2) où l'on présente notre modèle animal. On y discute des avantages et inconvénients que ce modèle comporte ainsi que des différents modèles animaux actuellement utilisés en préclinique dans le CCR.

**Tableau 2. Autopsie à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14.**

Xéno greffe tumoral	CR-IGR-0009P (n = 6)	CR-IGR-0014 P (n = 5)	CR-LRB-0010P (n = 4)
Récidive locale	5/6	1/5	0/4
Métastase hépatique	2 micrometastases	-	-



**Figure 21.** Coloration HES d'une micro-métastase obtenue à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14. (*Grossissement x10*)



**Figure 22.** Dosage de l'ACE à 3 mois d'évolution après résection de la tumeur primaire à J14.

## Article 2

Nous avons d'abord publié une revue qui présente le modèle animal utilisé dans l'article 3 actuellement en préparation.

### **Animal Models to Test Adjuvant Treatment: An Experimental Model of Colon Cancer**

Selma Becherirat, Fatemeh Valamanesh, Clarisse Eveno, Julie Sedbon, Thierry Andre, Marc Pocard

Revue publiée dans le journal : Current Colorectal Cancer Reports.



## Animal Models to Test Adjuvant Treatment: An Experimental Model of Colon Cancer

Selma Becherirat & Fatemeh Valamanesh & Clarisse Eveno & Julie Sedbon & Thierry Andre & Marc Pocard

Published online: 11 July 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** The recent failure of a clinical trial testing new adjuvant treatment administered after complete resection of localized colorectal cancer has shown the need for new animal models of this and similar pathology. However, animal models are the subject of debate for many reasons, including ethics, relevance, and cost. Here we develop an experimental model for use in testing adjuvant treatment of colon cancer. Different models of colon cancer are discussed, and limitations reported. An animal model of primary tumor resection using immune-deficient mice is proposed; treatment types which could be tested and biological information which could be obtained by use of this model are detailed; and limits of the method, including statistical limitations, are discussed and the first results of the model are reported.

**Keywords** Colorectal cancer · Microenvironment · Angiogenesis · Surgical resection · Adjuvant treatment · Animal models

### Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer for both men and women, and the fourth highest cause of cancer death worldwide [1]. The objective of adjuvant therapy is to target residual or micrometastatic disease remaining in newly-diagnosed cancer patients after removal, typically by surgery, of all detectable disease. Adjuvant chemotherapy is approved for use after potentially-curative resection for colon and other solid tumors.

For stage III CRC, three-year disease-free survival (DFS) without post-operative treatment is in the range 44–52% [2, 3]. Six months' combined oxaliplatin and fluoropyrimidine is the standard adjuvant treatment for stage III patients [4–6], and most recurrence occurs within three years of treatment [7]. In the metastatic setting irinotecan (as an addition to 5-FU) is equivalent to oxaliplatin [8]. However, three adjuvant-setting phase III trials of irinotecan, administered in combination with fluoropyrimidines for stage II and III colorectal cancer, found no benefit. This demonstrates that improved response rate (RR) and overall survival (OS) in the metastatic setting may not lead to benefit in the adjuvant setting [9–11].

Anti-angiogenic therapy and anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies have been shown to improve outcomes for patients with metastatic CRC [12]. When new therapy has efficacy against advanced metastatic disease, there may be interest in its possible use in the adjuvant setting. For the combination of bevacizumab, a humanized monoclonal antibody to VEGF, and chemotherapy [13, 14], this interest resulted in the NSABP-C08 and AVANT trials [15, 16], both of which failed. The same occurred with

---

S. Becherirat · F. Valamanesh · C. Eveno · J. Sedbon · M. Pocard (\*)  
INSERM U965 Angiogenesis and Translational Research  
(Paris-Diderot Paris 7 University), Hôpital Lariboisière,  
8 rue Guy Patin, 75475 Paris cedex 10, France  
e-mail: marc.pocard@inserm.fr

S. Becherirat  
e-mail: Selma.becherirat@inserm.fr

F. Valamanesh  
e-mail: fatemeh.valamanesh@inserm.fr

C. Eveno  
e-mail: clarisse.eveno@gmail.com

J. Sedbon  
e-mail: julie.sedbon@gmail.com

F. Valamanesh  
Fondation A. de Rothschild, 29, rue Manin, 75019 Paris, France

T. Andre  
Service d'Oncologie médicale, Hôpital Saint-Antoine,  
Assistance Publique des Hôpitaux de Paris,  
184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France  
e-mail: thierry.andre@sat.aphp.fr

cetuximab: no improvement of DFS or OS was observed during two studies evaluating cetuximab in combination with FOLFOX for stage III colon cancer [17, 18]. There is still a need for treatment targeting residual tumor lesions of early-stage disease, to increase the probability of patients remaining disease free for an extended period of time.

Hundreds of trials are in progress in the perioperative neo-adjuvant and adjuvant settings, and there is increasing awareness of the lack of appropriate preclinical testing that preceded these studies. New treatments must be evaluated by use of the most appropriate cancer models: observed benefits may not be as significant as for previous preclinical testing procedures, but this may be justified by increased clinical relevance. With better models it might be possible to determine at which stage a treatment is effective; for example, a treatment may slow micrometastatic disease but have no effect on localized tumors, or the opposite may be true. Most preclinical studies use xenografts, syngeneic implants or genetic models to evaluate the effect of drugs on established tumors. Unfortunately, these models are of limited relevance to the adjuvant setting.

When studying the effect of the local microenvironment and of stromal factors on tumor growth and metastasis, the ideal is to create models in which the tumor is implanted into the orthotopic site. For more than 50 % of animals, however, metastasis spreads to the liver when a colon tumor fragment is sutured on to the serosal side of the cecal wall [19]. To assess the potential of a new therapy, preclinical animal models must accurately replicate the progression of primary colon cancer, from local recurrence to spontaneous metastasis, and to avoid repeating past clinical trial errors, studies must be performed on preclinical models that closely mimic phase III clinical trials. Many review articles discuss these points [20, 21, 22].

This article proposes an experimental method for constructing a model for colon cancer adjuvant treatment testing taking into account limitations and potential results of other models.

#### Adjuvant Clinical Trial Failures with Targeted Therapy (NSABP C-08, AVANT, NCCTG, and PETACC8)

With bevacizumab and cetuximab, as with irinotecan, the ultimate cause of failure in clinical trials is unclear. Bevacizumab may have failed because arrested angiogenesis is a component of cell dormancy; experimental models have revealed that dormancy can protect tumor cells from chemotherapy. Cetuximab may affect stage IV disease but not micrometastatic disease because micrometastases have not yet become dependent on EGFR ligands for growth; it is possible that early-stage tumors are biologically different from metastatic disease.

On the basis of the data, use of bevacizumab or cetuximab for adjuvant treatment of patients with curatively resected

high-risk stage II and III colon carcinoma is not recommended. The data support the theory that primary tumors and metastatic lesions are distinct diseases, requiring different treatment. The unexpected results of the reviewed trials strongly support the need for preclinical models of different developmental stages of adjuvant colon cancer therapy, to enable better selection of drugs for evaluation in clinical trials.

#### Actual Preclinical Models

Adjuvant therapy is designed to treat micrometastatic disease in secondary organs, tumor cells that have left the primary tumor and regional lymph nodes but not yet formed an identifiable metastasis elsewhere, and residual cells left behind after surgery. Most preclinical tumor models simulate first-line treatment, rather than treatment in the adjuvant setting or in response to disease progression or development of drug resistance. To reflect the clinical setting, adjuvant models require primary tumor resection, meaning surgical expertise is needed. Technical modifications have led to the development of models that better represent early-stage disease, but an accurate adjuvant model of disease progression is still lacking.

#### Residual Disease Models

Although most preclinical tumor models evaluate the effect of treatment on established tumors, minor modifications could enable them to better reflect the biology of early-stage disease. Currently the primary tumor is first allowed to establish, after which either surgical excision or chemoablation with an aggressive treatment regimen is performed. Surgical excision is usual for subcutaneous tumors, even when the primary tumor is lung cancer; treatment is then initiated to control the residual disease that can reappear after a period of latency. This “residual disease model” is useful for modeling recurrence of primary disease but it does not reflect micrometastatic disease, nor the possible presence of a small number of dormant cancer cells. Several studies have revealed that primary tumors and metastasis lesions are distinct diseases, with different biology, microenvironment, and genetics [23–25].

#### Micrometastases Model

Another method for studying biology of early-stage disease is the “micrometastases model”, which uses selected xenografts or syngeneic tumors that reliably and reproducibly metastasize to a particular organ—usually bone, liver, lung, or brain. The implanted tumor may grow and metastasize before surgical

excision of the primary mass. In the mid-1970s some of the first preclinical adjuvant chemotherapy studies were performed, by subcutaneously implanting 26 murine colon tumor fragments into syngeneic immune-competent mice [26].

The “Van Gogh model”, in addition to being performed in immune-competent hosts, labels tumor cells with green fluorescent protein (GFP) and thus facilitates detection of tumor cells [27], enabling more reliable evaluation of factors affecting the dissemination and growth of metastatic cells in distant organs. A murine tumor cell line labeled with GFP is implanted in the ear pinnae of syngeneic, immune-competent mice. Established tumors are allowed to spontaneously disseminate, first to the designated sentinel lymph node and then to other sites including the lung [28, 29]. Surgical removal of the primary tumor by ear clipping is simple to perform, and treatment can begin just before or after resection of the primary tumor, thus modeling different adjuvant settings. The ear is an ideal site for tumor establishment and for metastasis via hematogenous or lymphatic networks, and this technique is likely to be extensively used for testing a variety of strategies, including adjuvant treatment.

#### Metastatic Disease Models

A variety of experimental methods have been used to model metastatic disease. Tumor cells can be seeded into the lung (via the tail vein or by direct injection), liver (portal or spleen injection), or brain (direct injection into adapted vessels), or injected directly in the heart [30, 31]. After injection, tumor cells circulate before lodging in the lung, liver, or other organs. The spleen can be removed after tumor cell injection to enable study of the effect of tested agents on systemic disease. However, such models do not accurately reflect the complete metastasis pathway, because they do not include temporal, spatial, and other key biological characteristics of metastasis formation as observed in patients. To achieve longitudinal follow-up of tumor progression and metastatic extension, and thus further evaluation of treatment efficacy, a cell line can be transfected with luciferase to enable in-vivo bioluminescent imaging [32]. This can be performed on orthotopic models which, as will be discussed below, reproduce the natural progression of cancer and, thus, should provide valuable information that cannot be obtained from other models.

#### Orthotopic and Genetically Engineered Mouse Models (GEMMs)

The last category of adjuvant study uses orthotopic models and GEMMs. Tumors are either implanted into their orthotopic site

or arise *de novo* in a specific organ. This approach enables analysis of the effect of the local microenvironment and stromal factors on tumor growth and metastasis. For example, colon tumor fragments can be sutured on to the serosal side of the cecal wall, after which more than 50 % of animals develop metastasis which spreads to the liver [19]. A study revealed that the chemosensitivity of tumors xenografted into the caecum of nude mice (their orthotopic site) was different from that of subcutaneously implanted xenografted tumors [33], indicating that colon cancer xenografted into the caecum might be more representative of clinical experience. An alternative approach is the focal induction of tumorigenesis by use of chemical carcinogens. Today transgenic mice are more often used, but chemical carcinogens were frequently used in the past. A 1983 study evaluated the efficacy of 5-FU by use of a preclinical model of adjuvant colon cancer. Administration of dimethylhydrazine to rats induced multiple tumors within the gastrointestinal tract, as had been previously reported [34]. Tumor-bearing rats were treated by surgical resection alone or by surgery with 5-FU. The combined treatment reduced the incidence of metastasis in the regional lymph nodes and liver to 17 % compared with 43 % after surgery alone [34]. Such studies are rare, but could indicate that testing drugs in an adjuvant model is feasible and can potentially provide interesting data relevant to human patients.

GEMMs of cancer reflect several aspects of the corresponding human cancer and have the potential to improve modeling of several cancer settings [35]. Transgenic mice can be designed to express oncogenes or have an organ-specific deletion of a relevant tumor suppressor. Appropriate modeling of intestinal cancer has been challenging, but progress has been made with mutations in the adenomatous polyposis coli locus (*Apc580D*) combined with an oncogenic *K-ras* allele [36]. These mice develop progressive adenocarcinoma of the small intestine, with 17 % of tumors having local invasion or metastasis, but do not develop colon cancer. Although use of endoscopic or laparoscopic surgery for these animals could convert this into a viable model of adjuvant intestinal cancer, the low incidence of metastasis and the technical challenges of surgery would still limit its use: small intestine resection on mice cannot be performed with high reproducibility and low morbidity, and is therefore incompatible with ethical considerations.

All these models lack the heterogeneity of most human cancer, limiting the predictive value of any one model. Another limitation of these models is that they are time-consuming and expensive, limiting their feasibility for widespread use.

#### Animal Models of Primary Tumor Resection

To more accurately represent human disease, a surgical resection model is probably necessary. We propose an original

orthotopic model of resected colon cancer in nude mice [37]. To achieve this, tumor fragments were subcutaneously grafted into six-week-old female nude mice. The tumor volume was measured twice weekly by use of a caliper, and animals were sacrificed when the tumor reached a volume of 1000 mm<sup>3</sup>. After resection of the subcutaneous tumor (Fig. 1a), 1 mm<sup>3</sup> tumor fragments were prepared (Fig. 1b) and surgically implanted in the colons of nude mice. The colon was exposed by a small midline incision (Fig. 1c) to enable implantation of the tumor fragment in the colon by means of 4-0 surgical sutures under the serosa of the ascending colon (Fig. 1d). Application of biological glue followed by peritoneal and skin closure completed the procedure (Fig. 1e, f). On day 14, to reproduce human clinical care, a midline laparotomy was performed to expose the colon (Fig. 1g), and a clip applied to ensure hemostasis and digestive integrity (Fig. 1h), and a clip applied to ensure hemostasis and digestive integrity. The colonic tumor was resected (Fig. 1i) and the tumor volume (cm<sup>3</sup>) calculated by use of the formula:  $V = \text{length} \times \text{width}^2 \times \pi / 6$  (Fig. 1j). Mice were monitored to analyze recurrence patterns, and were sacrificed on day 70 after resection.

Because they enable more accurate depiction of human tumor biological characteristics [38] and may better reflect clinical response, patient-derived xenograft (PDX) models should be used instead of cell line-derived xenografts for preclinical testing of new therapy [39–45].

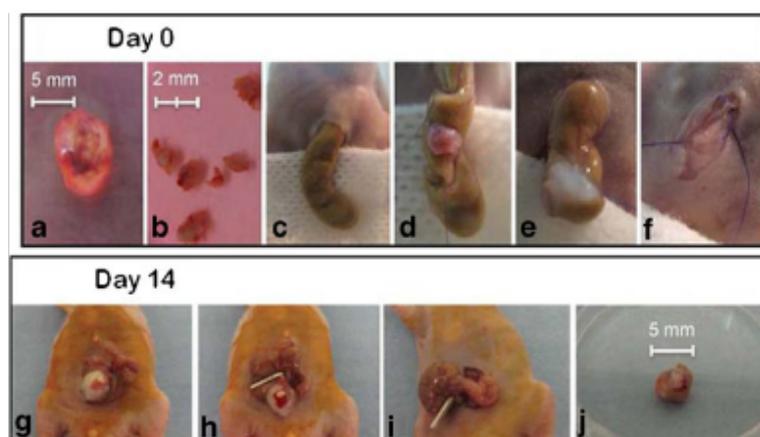
The heterogeneity of human cancer means it is important to study the effect of chemotherapy on a variety of tumors. To reflect the diversity of CRC we chose three human tumors with different molecular profiles and pharmacological responses, available from the Oncodesign Consortium [46]. The tumors were grafted and secondary-resected, as reported elsewhere, to enable us to study their evolution after surgery (Table 1).

The preliminary result that enabled us to validate this model was the level of carcinoembryonic antigen (CEA), a glycoprotein involved in cell adhesion which is not usually present in the blood of healthy adults but which has been detected in individuals with colorectal cancer [47]. An abnormal concentration is defined as  $>5 \text{ ng mL}^{-1}$  [48]. We performed an assay to compare concentrations in the three tumor strains. Although concentrations were different 2–4 months after resection, CEA levels were always abnormal, enabling us to confirm and quantify the presence of metastasis.

We also counted circulating tumor cells (CTC) in mouse blood by use of the Institute Curie personal method (not reported). Three weeks after resection of the colon cancer graft CTC were still present, indicating that disease persisted after cancer resection.

After surgery and adjuvant treatment, metastasis could be diagnosed by detecting cancer cells in different organs by use of histological analysis. However, this method can miss small liver or lung metastases, and detection of human DNA could be a more efficient method for detecting small tumor foci. There are several different potential methods, all of which have limitations. Use of the ALU sequence, as reported in forensic practice, is one possibility [49]; another is to use methods for visualizing and/or measuring the activity of autotaxin (ATX). ATX is a well-described secretory protein which, via lysophospholipase D activity, catalyzes the conversion of lysophosphatidylcholine (LPC) to lysophosphatidic acid (LPA). LPA is linked with progression of many types of cancer, and up-regulation of ATX in malignancies including breast, lung, colon, ovarian, stomach, and brain cancer is correlated with invasiveness and metastatic potential [50].

ATX-Red (tebu-bio, France) is an in-vivo imaging probe for visualizing and measuring ATX activity. It is an analog of



**Fig. 1** Intraoperative view of the primary tumor xenograft: (a) subcutaneous tumor ablation; (b) procurement of 1 mm<sup>3</sup> fragment; (c) exposure of the colon by small midline incision; (d) implantation of the tumor fragment by suture; (e) application of biological glue; (f) peritoneal and skin closure. Intraoperative view of the primary tumor

xenograft resection on day 14: (g) midline laparotomy, colon exposure; (h) clip application providing hemostasis and digestive integrity; (i) resection of colonic tumor; (j) specimen. This figure is reported in a publication in the journal *Oncology Reports* [33]

Table 1 Evolution of three types of primary tumor resection of patient-derived xenografts (PDX) of colon cancer

Human colon cancer tumor	Local recurrence 2–4 months after primary resection	Liver metastasis 2–4 months after primary resection	Lymph nodes metastasis 2–4 months after primary resection	CEA level 2–4 months after primary resection
CR-IGR-0014P (n=5)	3	0	1	23.68±8.96
CR-IGR-009P (n=6)	5	2 micrometastases	2	36.13±20.67
CR-LRB-010P (n=4)	0	0	0	19.17±6.35

CEA, carcinoembryonic antigen

the ATX substrate LPC and contains a near-infrared fluorescent tag (Licor IRDye 800CW) and quencher (Licor IRDye QC-1). Madan monitored in-vivo tumor progression after Xenograft implantation by use of ATX-Red administered intra-tumor or by systemic injection, and revealed ATX-Red to be an effective and non-invasive in-vivo imaging tool that enables real-time visualization and quantification of the progression of tumors expressing ATX [51].

#### Limitations and Advantages

Most preclinical analyses have been conducted either on GEMMs or in non-orthotopic sites (subcutaneously), and some have used human xenograft or syngenic mouse models to conduct studies of tumors in orthotopic sites. To assess the activity of therapeutic agents in the adjuvant setting, preclinical models that closely mimic the disease progression of human cancers are needed. However, all currently available models:

1. involve the growth of primary tumors in non-orthotopic sites,
2. are performed in immune-deficient hosts;
3. lack consistent and predictable metastatic dissemination; and
4. take place in the murine, rather than human, microenvironment of the stroma around the tumor cells.

These factors limit our ability to accurately predict the effect of new therapeutic regimens in the adjuvant setting. Table 2 summarizes the advantages and disadvantages of our model.

PDX models use xenografts derived directly from patient samples, without in-vitro manipulation, and have therefore attracted increasing interest for use in preclinical testing. As part of a consortium with the objective of developing and categorizing a new set of patient-derived CRC models [46\*\*], Julien et al. categorized 54 xenograft models at molecular, histological, and pharmacological levels to ensure they represented the diversity of clinical situations. They revealed that the frequency of mutation in the studied tumors was similar to that reported in the literature for colon cancer. Moreover, an

identical mutation profile was observed for xenografts derived from different tumor sites (primary tumor and carcinomatosis, synchronous, or metachronous metastasis) in the same patient. Differences through early and relatively late passages in terms of copy number alterations or gene profile, were relatively low, consistent with a remarkably stable gene expression profile for these models. As already described for other PDX [41, 42, 44, 45, 52, 53], the histological pattern of the studied xenografts was well-preserved compared with patient tumors, and was consistent with the clinical diversity of human colorectal pathology. Preservation of the architecture of the original tumors, including the lymphatic and blood vasculature, is a major advantage of these models over cell-line derived xenografts, although it has been revealed that the stroma component of PDX becomes mainly murine after a few passages. This ability to transplant fresh tumor tissue from patients into large numbers of immunodeficient mice to model clinical situations has many potential applications, including detection and validation of prognostic and predictive markers, enabling better understanding of cancerogenesis and better preclinical testing of new therapy.

Our model reflects the clinical situation but does not reproduce the natural progression of tumors, which usually

Table 2 Advantages and disadvantages of animal models of primary tumor resection of patient-derived xenografts (PDX) using immunodeficient mice

Advantages	Disadvantages
Mimic the clinical situation	Do not mimic the natural history of the primary tumor's growth
Metastasis or local recurrence reflect the entire complex disease pathway, providing a high possibility of cell–cell interaction	The stroma of PDX becomes mainly murine after a few transplants
Conserve the architecture of original colon tumors from PDX	Involve the growth of primary tumors in non-orthotopic sites
After resection the animal can be cured, or local recurrence and/or metastasis can occur	Performed in immune-deficient hosts
If human DNA is detected it could be regarded as a micrometastasis	Lack consistent and predictable metastatic dissemination because of high clinical variability

initiate from the mucosal surface [54]. In our model the metastatic process starts after the main cancer growth has already occurred. To date it is not known whether metastasis begins early in the cancer growth cycle.

The last important limitation of these models is that the animals used are non-immune efficient, which is unavoidable when the main objective of studies is to use human colon cancer cells to test how those cells react to treatment.

### The Statistical Limitation

The number of animals required to test an improvement resulting from treatment is important and usually not evaluated. Cost and ethics limit the number of animals that can be used for models. For 3,000 patients to participate in a human adjuvant trial is not unusual, but using 3,000 mice to test an adjuvant treatment is impossible. It could be argued that the homogeneity of mice and heterogeneity of humans results in a lower variability in animal studies, and therefore fewer subjects are required.

However, large numbers of animals can still be required to test a limited improvement. For example, according to adjuvant clinical trial results, addition of avastin to FOLFOX results in a 2 % improvement among 3,000 patients. Taking this into account and supposing that, unlike humans, all the mice are identical, we will need 428 mice in our study to achieve a 15 % improvement: 289 mice in the FOLFOX group and 139 in the FOLFOX + avastin group. Using this many animals, the test of proportion's comparison power will be >95 %. As the proportion requirement is only 80 %, we can reduce the number of animals needed to 151 in the FOLFOX group and 72 in the FOLFOX + avastin group. The number of animals needed to achieve the expected improvement would, therefore, be a challenge for the study.

### Conclusion

As mentioned by Van Cutsem et al. [22•], in view of disappointing results from recent trials of molecularly targeted agents against stage II and/or III colon cancer, there is a need to identify new potential strategies for adjuvant treatment of colon cancer. Because adjuvant trials are long, expensive, and require the participation of thousands of patients, it would be valuable to have access to preclinical models predictive of early-stage disease. Patient-derived xenograft models are believed to represent the heterogeneity of human cancer, and use of advanced preclinical models could avoid ineffective clinical trials.

### Compliance with Ethics Guidelines

**Conflict of Interest** Selma Becherirat is supported by grants from the Fondation de France and Fondation de l'Avenir.

Fatemeh Valamanesh declares that she has no conflict of interest.

Clarisse Eveno declares that she has no conflict of interest.

Julie Sedbon declares that she has no conflicts of interest.

Thierry André has received compensation from Roche and Sanofi for service as a consultant, and payment for lectures including service on speakers' bureaus from Roche.

Marc Pocard is supported by grants from the Fondation de France and Fondation de l'Avenir; has received compensation from Janssen Cilag, LEO Pharma, Pfizer, Roche, and Sanofi for service as a consultant or board member; has received institutional funding through grants and/or compensation from Amgen, Ethicon, Fujinon, Gamida, Genentech, Ipsen, Storz, Sanofi, and Roche; has received payment for the development of educational presentations from Sanofi, Roche, and Ipsen; has received reimbursement for travel/accommodations/meeting expenses from Roche, Gamida, and Amgen.

**Human and Animal Rights and Informed Consent** This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

### References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Colorectal Cancer [Internet]. [cité 29 mai 2013]. Disponible sur: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>.
2. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 1990;322:352–8.
3. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet*. 1995;345:939–44.
4. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:3109–16.
5. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*. 2011;29:3768–74.
6. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:1465–71.
7. Benson AB. Chemotherapy: adding oxaliplatin to the equation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:620–2.
8. Lucas AS, O'Neil BH, Goldberg RM. A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10:238–44.
9. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol*. 2007;25:3456–61.

10. Ychou M, Raoul J-L, Douillard J-Y, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol.* 2009;20:674–80.
11. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol.* 2009;27:3117–25.
12. Chibaudel B, Tournigand C, André T, et al. Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2012;4:75–89.
13. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2335–42.
14. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008;26:2013–9.
15. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol.* 2011;29:11–6.
16. De Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll H-J, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:1225–33. After the failure of this study, this is definitely the last clinical trial conducted without a prior preclinical study.
17. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *J Am Med Assoc.* 2012;307:1383–93.
18. Taieb J, Tabernero J, Mini E, et al. Adjuvant FOLFOX4 with or without cetuximab (CTX) in patients (pts) with resected stage III colon cancer (CC): DFS and OS results and subgroup analyses of the PETACC8 intergroup phase III trial. *Annals Oncol.* 2012; 23; supplement 3, Late Braking Abstract 4.
19. Schackert HK, Fidler IJ. Development of an animal model to study the biology of recurrent colorectal cancer originating from mesenteric lymph system metastases. *Int J Cancer.* 1989;44:177–81.
20. Ebos JML, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:210–21.
21. Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, et al. Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale. *Trends Mol Med.* 2010;16:122–32.
22. Van Cutsem E, Lambrechts D, Prenen H, et al. Lessons from the adjuvant bevacizumab trial on colon cancer: what next? *J Clin Oncol.* 2011;29:1–4. The authors explain the significance of developing new animal models that accurately replicate the natural history of cancer for testing therapeutic agents in preclinical before clinical trials.
23. Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2002;12:89–96.
24. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the « seed and soil » hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:453–8.
25. Podsypanina K, Du Y-CN, Jechlinger M, et al. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science.* 2008;321:1841–4.
26. Schabel Jr FM. Surgical adjuvant chemotherapy of metastatic murine tumors. *Cancer.* 1977;40:558–68.
27. Tester AM, Ruangpanit N, Anderson RL, et al. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial–mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18:553–60.
28. Hirayama R, Sato K, Hirokawa K, et al. Different metastatic modes of malignant melanoma implanted in the ear of young and old mice. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;18:209–14.
29. Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res.* 2006;66:8065–75.
30. Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, et al. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res.* 1984;44:3522–9.
31. Warren RS, Yuan H, Matti MR, et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 1995;95:1789–97.
32. Mordant P, Loriot Y, Lahon B, et al. Bioluminescent orthotopic mouse models of human localized non-small cell lung cancer: feasibility and identification of circulating tumour cells. *PLoS One.* 2011;6:e26073.
33. Pocard M, Tsukui H, Salmon RJ, et al. Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In Vivo.* 1996;10(5):463–9.
34. House AK, Maley MA. Clinical and in vivo response following surgery or surgery plus adjuvant chemotherapy or immunotherapy for colorectal carcinoma in a rat model. *J R Soc Med.* 1983;76:833–40.
35. Singh M, Johnson L. Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5312–28.
36. McCart AE, Vickaryous NK, Silver A. Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol Res Pract.* 2008;204:479–90.
37. Eveno C, Contreras J-O, Hainaud P, et al. Netrin-4 overexpression suppresses primary and metastatic colorectal tumor progression. *Oncol Rep.* 2013;29:73–8.
38. Cree IA, Glaysher S, Harvey AL. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10:375–9.
39. Fichtner I, Slisow W, Gill J, et al. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur J Cancer.* 2004;40:298–307.
40. Fibig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer.* 2004;40:802–20.
41. Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85:217–21.
42. Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, et al. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorigrafts in patients with advanced cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:1311–6.
43. Krumbach R, Schüler J, Hofmann M, et al. Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: activation of MET as one mechanism for drug resistance. *Eur J Cancer.* 2011;47:1231–43.
44. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts (« xenopatiens ») identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2011;1:508–23.
45. DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med.* 2011;17:1514–20.
46. Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, et al. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:5314–28. The authors show that use of PDX models is the

- better way of representing the heterogeneity of human cancers and, above all, of evaluating novel targeted therapeutic strategies.
47. Cancer Diagnosis - Understanding Cancer - Stanford Cancer Center - Stanford Medicine [Internet]. [cité 29 mai 2013]. Disponible sur: <http://cancer.stanford.edu/information/cancerDiagnosis/>.
  48. Wang JY, Tang R, Chiang JM. Value of carcinoembryonic antigen in the management of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1994;37:272–7.
  49. Nicklas JA, Noreault-Conti T, Buel E. Development of a real-time method to detect DNA degradation in forensic samples. *J Forensic Sci*. 2012;57:466–71.
  50. Harper K, Arseneault D, Boulay-Jean S, et al. Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res*. 2010;70:4634–43.
  51. Abstract 359: Longitudinal monitoring of autotaxin-expressing tumors in vivo using an activatable near-infrared fluorescent probe—Madan 72 (1008): 359—*Cancer Research* [Internet]. [cité 29 mai 2013]. Disponible sur: [http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/meeting\\_abstract/72/8\\_MeetingAbstracts/359](http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/meeting_abstract/72/8_MeetingAbstracts/359).
  52. Némethi F, Sastre-Garau X, Laurent C, et al. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2352–62.
  53. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3989–98.
  54. Takahashi Y, Ellis LM, Wilson MR, et al. Progressive upregulation of metastasis-related genes in human colon cancer cells implanted into the cecum of nude mice. *Oncol Res*. 1996;8:163–9.

## **Article 3 (en préparation)**

### **Matériels et méthodes**

#### **Modèle de greffe orthotopique en intra-caecal chez la souris**

Les souris *nude* ont été greffées à 6 semaines avec les xénogreffes tumorales CR-IGR-0014P ou CR-IGR-0009P. Sous anesthésie générale gazeuse, une incision médiane est effectuée chez les souris anesthésiées. Le caecum est extériorisé. La greffe est exécutée par suture et enfouissement intra-caecal du fragment tumoral avec du vicryl 4.0. L'étanchéité est assurée par l'application de colle biologique (Tissucol® Baxter); puis le caecum est réintroduit dans la cavité péritonéale et la fermeture pariétale se fait à l'identique.

A J14, les souris sont réopérées; l'incision médiane est reprise ; le caecum est extériorisé, la tumeur est réséquée (l'hémostase et l'étanchéité digestive est assurée par un clip). Puis l'incision péritonéale est refermée par du vicryl 4.0 et la peau suturée par des agrafes de Michel (Figure 22).

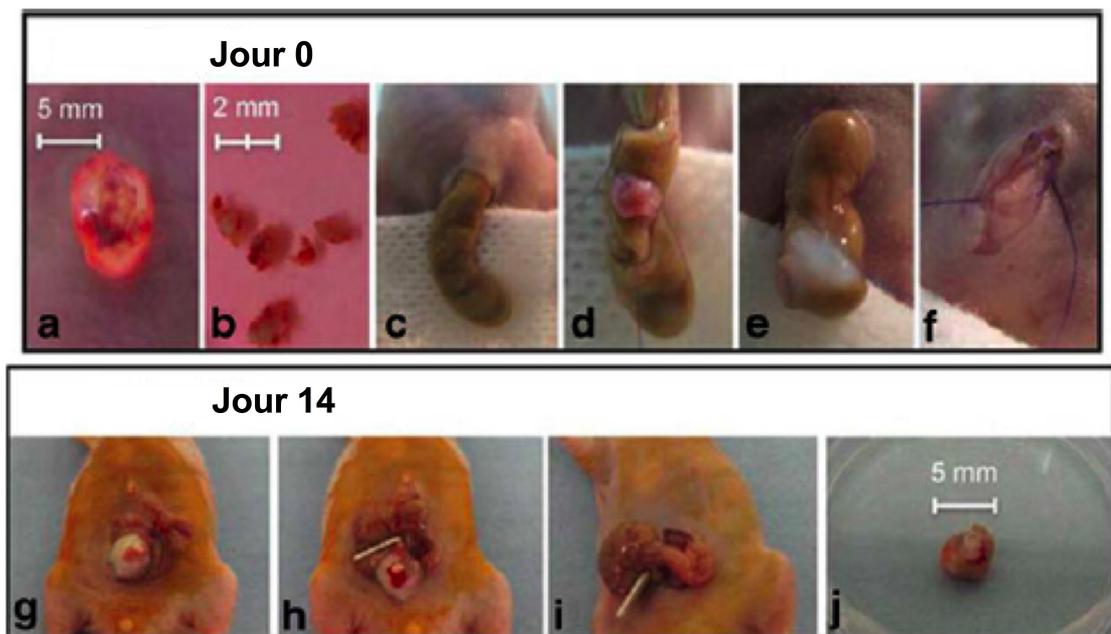
#### **Traitements**

Les souris ont été alors randomisées en 4 groupes : contrôle, bevacizumab, 5-FU/oxaliplatine, et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine (10 souris/bras). Le traitement a été administré en intra-péritonéale pendant 2 mois sous forme de deux injections/semaine pour le bevacizumab (5 mg/kg) et une toutes les 2 semaines pour les chimiothérapies (5-FU 30 mg/kg et oxaliplatine 12,5 mg/kg). Parmi les 10 souris/bras, 5 souris ont été mises à mort à la fin du traitement (groupe A) et les 5 autres un mois après l'arrêt du traitement (groupe B) (Figure 23).

#### **Analyses histologiques**

Juste après la mise à mort des souris une nécropsie a été réalisée afin d'identifier d'éventuelles récurrence locale, nodules péritonéaux ou métastases. Ces tissus tumoraux ainsi que les organes (foies, poumons et ganglions mésentériques) ont été récupérés afin de vérifier le caractère tumoral des tissus ou de chercher les éventuelles métastases en histologie. Dans ce but, les différents tissus ont été fixés dans du formol (4 %) avant de subir des cycles de déshydratation dans une série d'alcool et être inclus en paraffine (Département d'anatomopathologie, hôpital Lariboisière, Paris). Après l'inclusion en paraffine, des sections au microtome de 5 µm ont été montées sur lames et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran

(HES). Les ganglions mésentériques ont également été colorés au cytokératine (CK) AE1-AE3, ce marquage immuno-histochimique a été effectué afin de mettre en évidence la présence de cellules épithéliales dans les ganglions et par conséquent des métastases ganglionnaires. Les lames ont été analysées par microscope optique (Laborlux D, Leitz, Kremlin-Bicêtre, France) à un grossissement de l'objectif de x2,5, x10, x20, ou x40. (Seule une partie des coupes au CK AE1-AE3 a été analysée, la lecture des lames est toujours en cours)



**Figure 23. Modèle de greffe orthotopique de CCR avec reprise chirurgicale.**

Xéno greffe à J0 a) fragment de tumeur CCR, b) tumeur fragmentée d'1 à 2 mm, c) caecum extériorisé, d) greffe exécutée par suture, e) xéno greffe recouverte de colle biologique, f) fermeture pariétale. 14 jours suivant la greffe g) caecum extériorisé, h) tumeur réséquée par la mise en place d'un clip, i) caecum réséqué, j) xéno greffe tumorale réséquée. (Eveno C, et al. 2013)

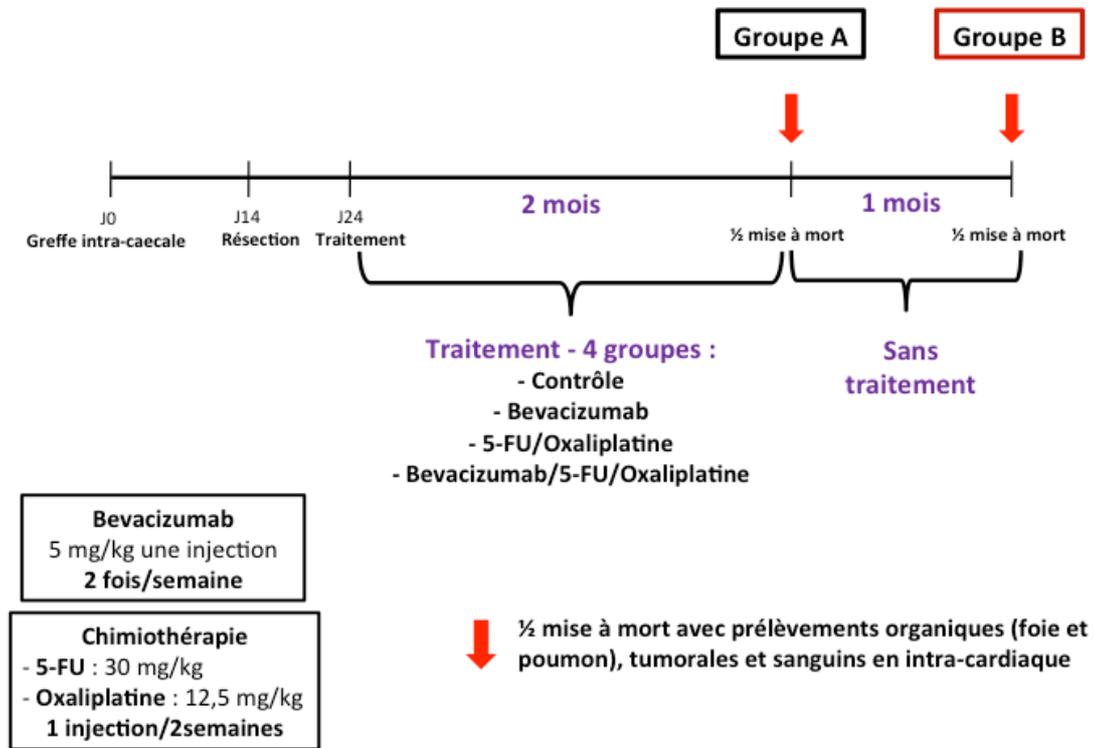


Figure 24. Schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole.

### Dosage radio-immunologique

Le sang périphérique a été récupéré dans des tubes héparinés par ponction cardiaque de souris anesthésiées (immédiatement avant que les souris aient été sacrifiées). Le sang a ensuite été centrifugé à 2000 rpm pendant 15 minutes et le plasma collecté. Les dosages radio-immunologiques ont été effectués dans le plasma pour le VEGF, PIGF et HGF selon les instructions du fabricant (R & D Systems Inc., France).

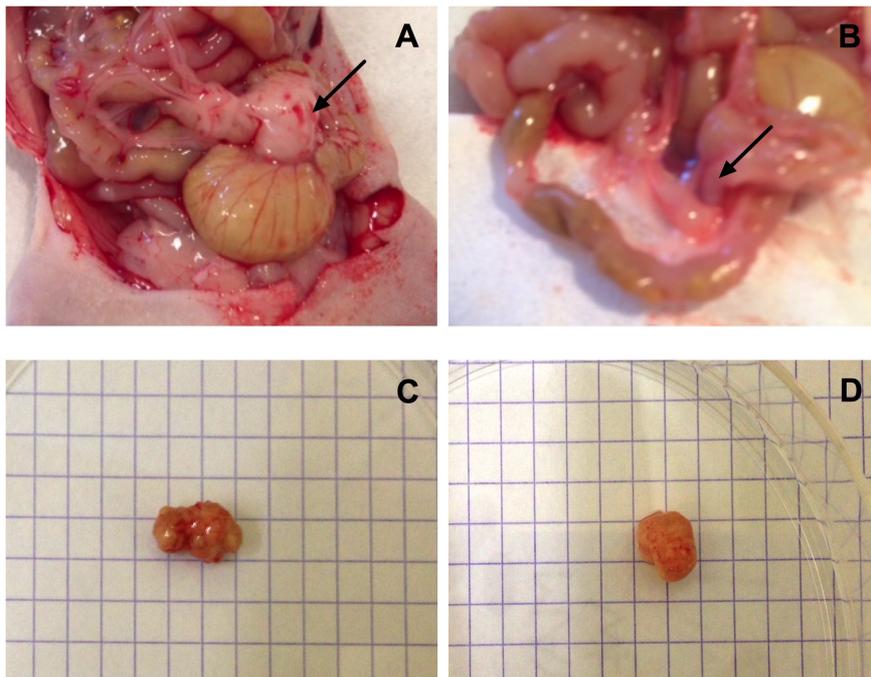
### Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad, San Diego, USA). Les données quantitatives entre les bras de traitements (contrôle, bevacizumab, 5-FU/oxaliplatine, bevacizumab/5-FU/oxaliplatine) ont été analysées par test ANOVA suivi d'une correction *post-hoc* de Dunn's. Les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  SD (Déviation Standard). Une valeur de  $p$  inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative.

## Résultats

### Autopsie et recherche de rechute tumorale

Après la mise à mort des souris une autopsie a été réalisée sur chacune d'entre elles afin de mesurer macroscopiquement l'évolution tumorale pour les différents groupes de traitement (Figure 24). Ainsi, pour chaque groupe nous avons récupéré et quantifié macroscopiquement, les récurrences locales et les nodules de carcinoses. Nous avons vérifié en immunohistochimie le caractère tumoral pour chacun de ces tissus. Par ailleurs, la recherche de métastases hépatiques, pulmonaires et ganglionnaires a également été réalisée pour les 2 xénogreffes tumorales. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 3.



**Figure 25. Photographies de tumeurs obtenues après autopsies des souris.**

A) Récidive locale du groupe contrôle (CR-IGR-0009P) et B) Nodule de carcinose du groupe bevacizumab (CR-IGR-0009P) avant isolement à partir des tumeurs (flèche). C) et D) récurrences locales isolées des groupes contrôle et bevacizumab, respectivement.

**Tableau 3. Récapitulatifs des résultats obtenus après autopsie et études immuno-histochimiques.**

	Groupe A				Groupe B			
	contrôle	beva	5-FU/oxa	beva/5-FU/oxa	contrôle	beva	5-FU/oxa	beva/5-FU/oxa
<b>CR-IGR-0009P</b>								
<b>Récidive locale</b>	14 % (1/7)	43 % (3/7)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	20 % (2/10)	10 % (1/10)	0 % (0/6)	0 % (0/6)
<b>Nodule de carcinose</b>	0 % (0/7)	14 % (1/7)	0 % (0/6)	66 % (4/6)	10 % (1/10)	20 % (2/10)	0 % (0/6)	33 % (2/6)
<b>Méta hépatique</b>	0 % (0/7)	14 % (1/7)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	0 % (0/10)	0 % (0/10)	0 % (0/6)	0 % (0/6)
<b>Méta ggl</b>	0 % (0/7)	0 % (0/7)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	0 % (0/10)	10 % (1/10)	0 % (0/6)	0 % (0/6)
<b>CR-IGR-0014P</b>								
<b>Récidive locale</b>	20 % (1/5)	33 % (2/6)	0 % (0/4)	0 % (0/4)	0 % (0/6)	17% (1/6)	0 % (0/5)	0 % (0/6)
<b>Nodule de carcinose</b>	0 % (0/5)	17% (1/6)	0 % (0/4)	0 % (0/4)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	0 % (0/5)	0 % (0/6)
<b>Méta hépatique</b>	0 % (0/5)	17% (1/6)	0 % (0/4)	0 % (0/4)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	0 % (0/5)	0 % (0/6)

beva : bevacizumab ; oxa : oxaliplatine ; méta : métastase ; ggl :ganglionnaire

La chimiothérapie semble rester la meilleure des options en situation adjuvante puisque aucun signe de cancer n'a été observé pour ce bras de traitement et pour les 2 xénogreffes tumorales. Aussi, comme nous avons pu le constater lors du développement du modèle, la xénogreffe CR-IGR-0014P est moins agressive que la CR-IGR-0009P. Néanmoins, nous avons tout de même observé 33 % (2/6) de récurrence locale, un nodule de carcinose et une métastase hépatique pour les souris traitées au bevacizumab dans le groupe A. Seul une récurrence locale a été observée pour ce même bras de traitement dans le groupe B. En ce qui concerne la xénogreffe CR-IGR-0009P, nous avons observé un développement tumoral dans les bras contrôle, bevacizumab et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine. Cela dit, le développement tumoral est plus important dans les bras de traitement comportant le bevacizumab (en monothérapie ou associée à la chimiothérapie). En effet, dans le groupe A, nous avons observé 43 % (3/7) de récurrence locale, un nodule de carcinose et une métastase hépatique dans le bras bevacizumab. En revanche, dans le groupe B nous avons observé une récurrence locale, deux nodules de carcinoses et une métastase ganglionnaire. Dans le bras bevacizumab/5-FU/oxaliplatine nous n'avons pas observé de récurrence locale dans les groupes A et B. Cependant, 66 % (4/6) de nodules de carcinoses ont été observés pour le groupe A et 33 %

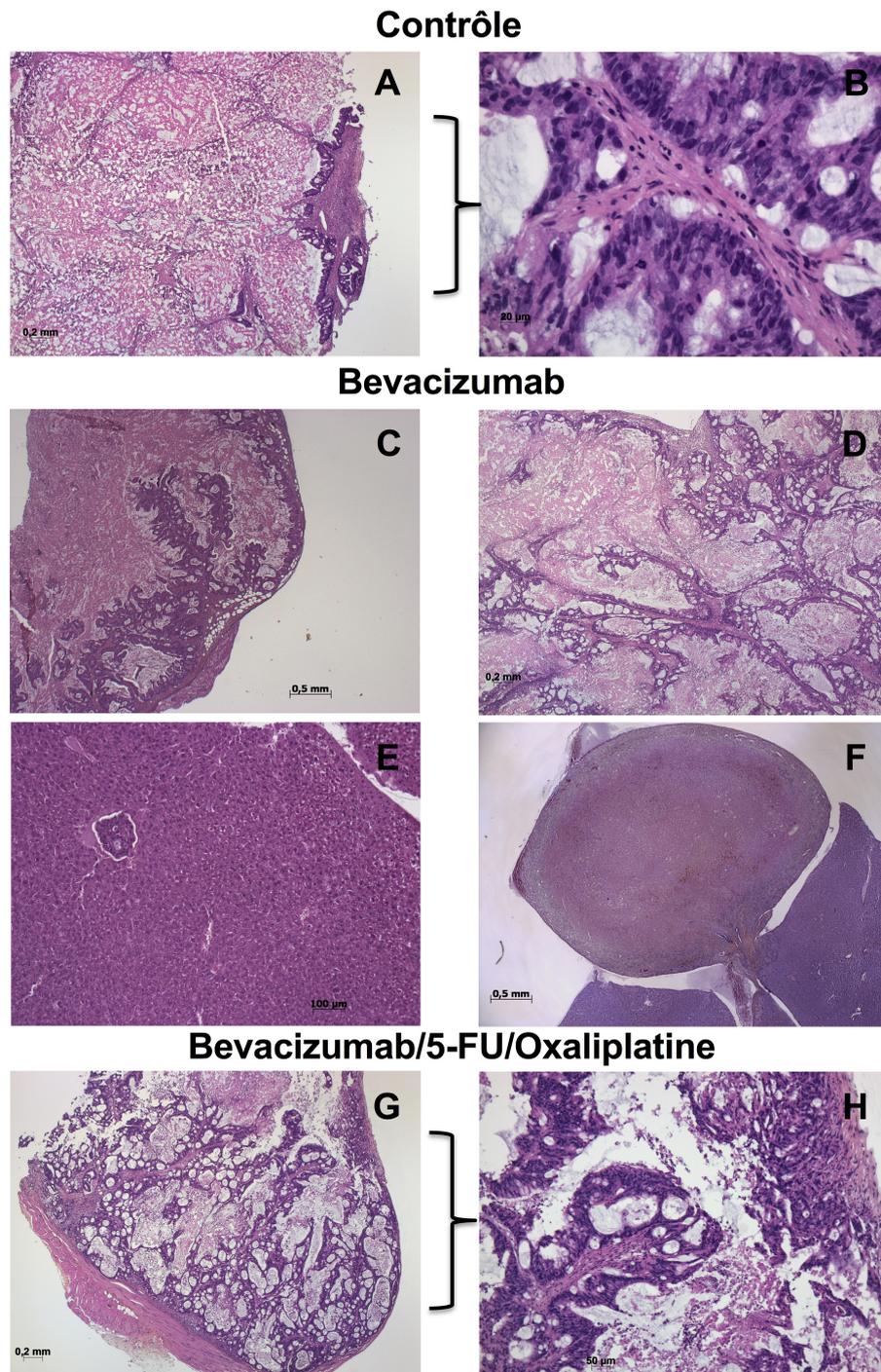
(2/6) de nodules de carcinomes dans le groupe B. Il ne semble pas y avoir de différence entre les groupes A et B indiquant que le fait de stopper l'AAG n'aggrave pas la maladie. Aucune métastase pulmonaire n'a été mise en évidence.

### **Coloration HES et AE1-AE3**

(Figure 25 et 26)

### **Dosage des facteurs pro-angiogéniques**

Le dosage radio-immunologique du VEGF dans le plasma a révélé dans le groupe A une diminution significative entre les bras contrôle et bevacizumab ( $p < 0,05$ ) et entre les bras contrôle et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine ( $p < 0,01$ ) pour les 2 xénogreffes tumorales. Dans le groupe B, une diminution significative supplémentaire est observée entre les bras 5-FU/oxaliplatine et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine ( $p < 0,05$ ) pour les 2 xénogreffes tumorales également (Figure 27). En ce qui concerne le PlGF, nous avons observé une diminution significative entre les bras contrôle et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine dans le groupe A et dans les 2 xénogreffes tumorales. Cet effet est conservé dans le groupe B et dans les 2 xénogreffes tumorales ( $p < 0,001$ ). Pour la xénogreffe CR-IGR-0014P, une diminution significative supplémentaire est observée entre les bras contrôle et bevacizumab ( $p < 0,05$ ) et les bras 5-FU/oxaliplatine et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine ( $p < 0,05$ ) (Figure 28). Le même effet de diminution significative pour l'HGF entre les bras contrôle et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine est observé dans les groupe A et B. On observe également une diminution significative entre les bras contrôle et bevacizumab dans la xénogreffe CR-IGR-0009P ( $p < 0,05$ ) dans le groupe B. Cependant, dans la xénogreffe CR-IGR-0014P cette même diminution est observée entre les bras 5-FU/oxaliplatine et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine ( $p < 0,05$ ) dans le groupe B également (Figure 29). Ces résultats démontrent à nouveau l'efficacité du bevacizumab à inhiber le VEGF. Par ailleurs, on observe un effet systémique du bevacizumab, puisque le bevacizumab entraîne une diminution de l'expression du PlGF et de l'HGF. De plus, l'association à la chimiothérapie semble potentialiser cette inhibition. En effet, l'inhibition de ces facteurs pro-angiogéniques dans le bras de traitement bevacizumab/5-FU/oxaliplatine a été constamment observée et elle était par ailleurs, plus marquée, et ceci dans les 2 xénogreffes tumorales. De manière inattendue, l'inhibition des facteurs pro-angiogéniques est d'avantage observée dans le groupe B.



**Figure 26. Coloration HES des tumeurs.**

A) Nodule de carcinose péritonéal du bras contrôle, groupe B (*Grossissement x2,5*), B) *Grossissement x10* de A, C) Récidive locale du bras bevacizumab, groupe A (*Grossissement x2,5*), D) Nodule de carcinose péritonéal du bras bevacizumab, groupe B (*Grossissement x2,5*), E) Métastase hépatique (même souris que C) (*Grossissement x10*), F) Métastase hépatique du bras bevacizumab, groupe A (*Grossissement x2,5*), G) Nodule de carcinose péritonéal du bras bevacizumab/5-FU/oxaliplatine, Groupe A (*Grossissement x2,5*), H) *Grossissement x10* de G. Toutes les xéno greffes sont issues de la xéno greffe CR-IGR-0009P, excepté la métastase hépatique (F) qui provient de la CR-IGR-0014P.

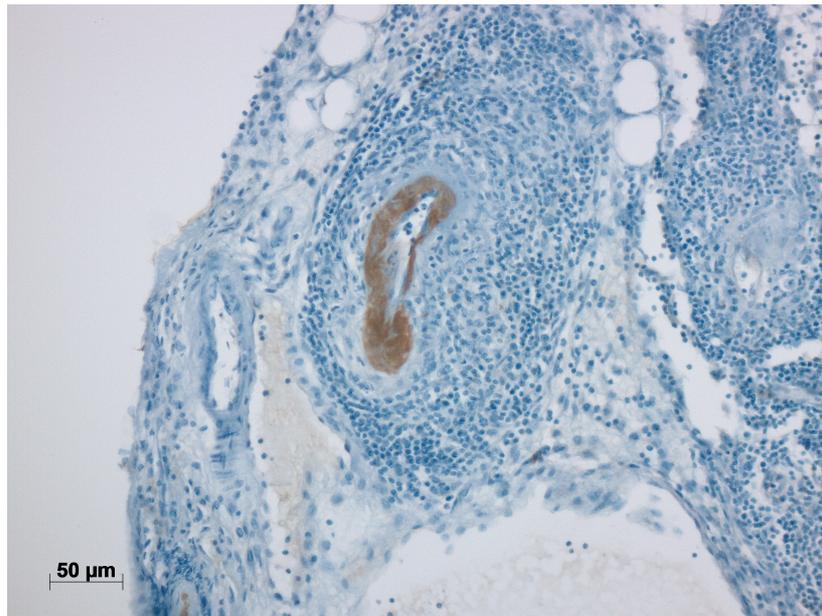


Figure 27. Métastase ganglionnaire marquée au CK AE1-AE3. (Grossissement x20)

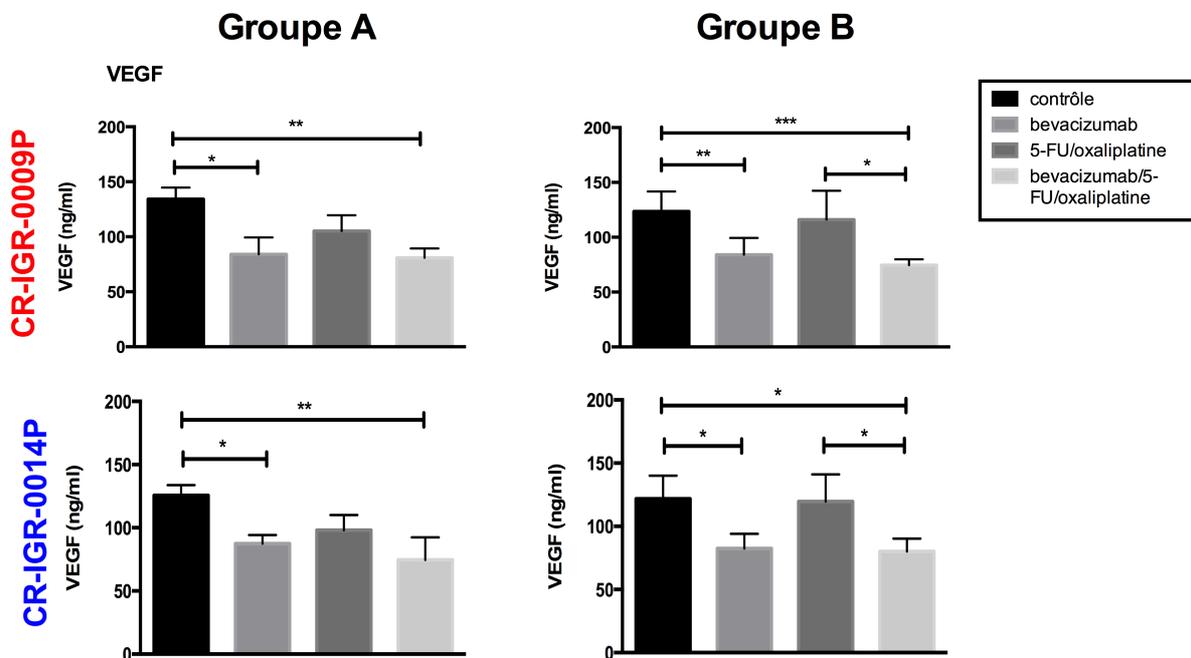


Figure 28. Dosage radio-immunologique du VEGF dans le plasma.

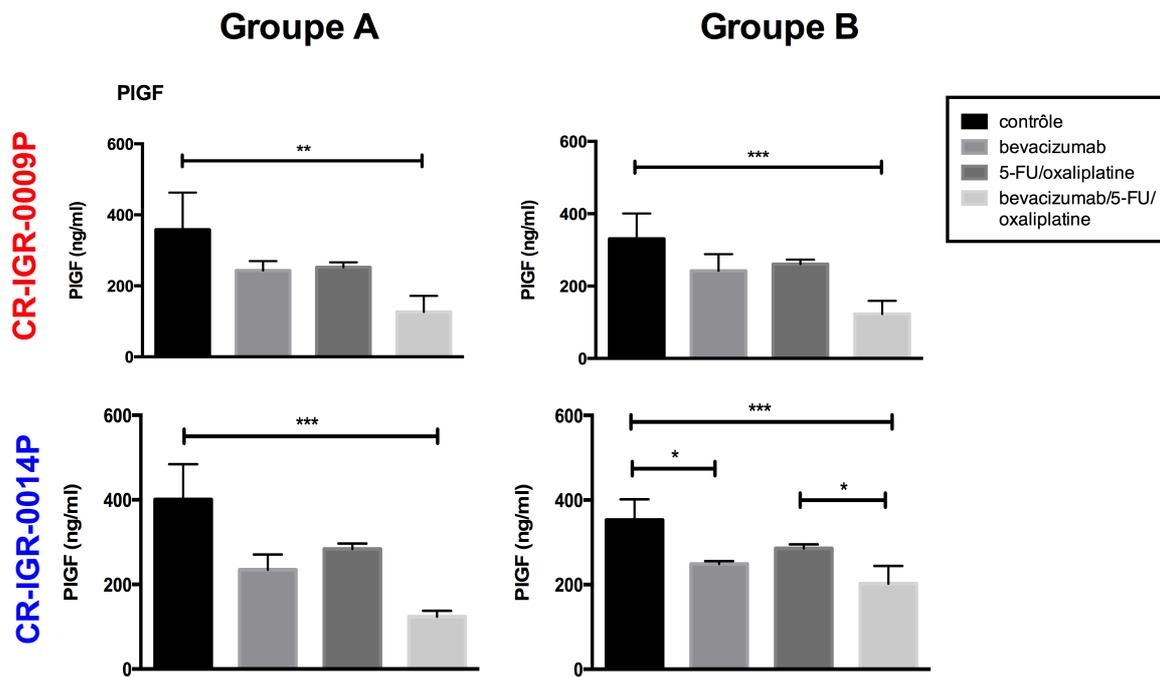


Figure 29. Dosage radio-immunologique du PIGF dans le plasma.

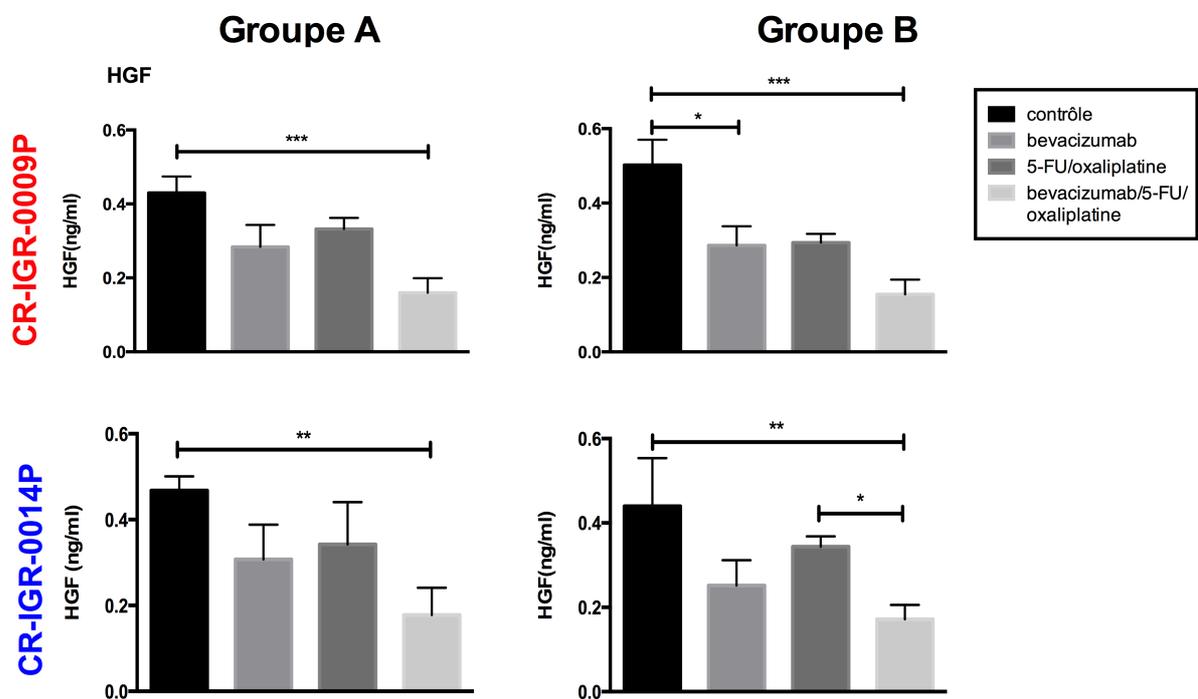


Figure 30. Dosage radio-immunologique de l'HGF dans le plasma.

## Conclusion

Nous avons pu reproduire avec notre modèle animal une situation clinique, afin de déterminer les causes de l'échec de l'association d'une chimiothérapie standard au bevacizumab en traitement adjuvant dans le CCR. Les résultats obtenus permettent de confirmer expérimentalement, dans un modèle animal pertinent, l'effet pro-métastatique du bevacizumab. En effet, nous avons observé d'avantage de cas avec une évolution tumorale avancées chez les souris traitées au bevacizumab en monothérapie et associées à la chimiothérapie. Les dosages de facteurs pro-angiogéniques ont également révélé un effet systémique du traitement. En effet, une diminution conséquente des facteurs VEGF, PlGF et HGF a été observée pour les souris traitées au bevacizumab et au bevacizumab/5-FU/oxaliplatine. En revanche, la diminution de ces facteurs pro-angiogéniques dans le bras de traitement bevacizumab/5-FU/oxaliplatine s'est avérée systématique et plus marquée. Ces résultats peuvent indiquer un effet potentialisé par l'association de la chimiothérapie au bevacizumab. De même que le changement de taux des facteurs de croissance contribuerait potentiellement à la progression tumorale à différents sites.

L'intégrité vasculaire est connue pour être un facteur important contrôlant la survenue des métastases. Un mécanisme possible serait donc que les traitements ciblant le VEGF altèreraient l'intégrité des vaisseaux et favoriseraient l'extravasation (passage d'une cellule tumorale dans la lumière d'un vaisseau pour coloniser un nouvel organe) des cellules tumorales. Par conséquent, ces dommages vasculaires entraîneraient une augmentation de « l'ensemencement » de sites métastatiques. Certaines études ont en effet déjà mis en évidence une augmentation de métastases due à une altération de l'intégrité des vaisseaux (Welti et al. 2012; Chung et al. 2012).

Pour tenter de comprendre l'effet pro-métastatique, une analyse du remodelage de la MEC au niveau des récidives locales et des nodules péritonéaux en dosant des métalloprotéases et HIF-1 $\alpha$  ainsi que l'analyse de l'architecture vasculaire par immunofluorescence restent à réaliser.

Les résultats de cette étude, sont actuellement en cours d'écriture pour une publication scientifique en premier auteur.

# **DISCUSSION GENERALE**



Si le concept de néo-angiogenèse tumorale a été étudié dès les années 1960, l'arrivée des thérapies AAG est récente. Les dernières années ont été marquées par un développement exponentiel de multiples agents AAG, anticorps ou molécules ITK. L'apparition de ces thérapies ciblées a révolutionné le traitement des cancers et trouve aujourd'hui toute leur place dans l'arsenal thérapeutique. Cependant, comme dans le cas des thérapies conventionnelles, des résistances aux traitements interviennent. Un des enjeux majeurs est d'améliorer les traitements et la prise en charge thérapeutique des patients. D'autant plus que d'après une étude publiée en 2012 dans la revue « The Lancet Oncology », l'incidence des cancers devrait augmenter de 75 % d'ici à 2030 et avec une progression plus importante dans les pays les plus pauvres de plus de 90 % (Bray et al. 2012).

Le but de cette thèse a été de reproduire deux situations cliniques afin de tenter de comprendre, dans la première, pourquoi chez certains patients la reprise de la croissance tumorale est accélérée lors de l'arrêt d'un AAG ou durant une inter-cure, et la deuxième situation clinique, pourquoi l'association du bevacizumab à la chimiothérapie standard s'est soldée par un échec en situation adjuvante.

Le premier article nous a permis de confirmer qu'un traitement discontinu au bevacizumab entraîne une accélération de l'évolution tumorale. En effet, nous avons pu mettre en évidence deux mécanismes impliqués qui ont été décrits par *Bergers et Hanahan* (Bergers and Hanahan 2008). Le premier étant le recrutement des péricytes, impliqués dans l'intégrité vasculaire et le second mécanisme est l'activation de voies alternatives de signalisations pro-angiogéniques. Dans le schéma 30J (traitement court) nous avons observé que le traitement au bevacizumab induit l'inhibition du VEGF et qu'aucune différence n'a été constatée pour le PlGF. Néanmoins, une diminution significative a été observée pour l'HGF. De plus, il entraîne efficacement une inhibition de la néo-vascularisation tumorale. Dans le schéma 50J, groupe D, nous avons observé une augmentation significative de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, PlGF et HGF) par rapport au groupe C. De la même manière, une forte reprise de la vascularisation avec augmentation significative de cellules positives pour le CD31 (cellules endothéliales) et de cellules positives pour la desmine (péricytes) a été observée. Cet effet s'est traduit par un « effet rebond » que l'on a observé lors du suivi de la croissance tumorale. Concernant le schéma 70J (groupe F), le même effet est observé pour les facteurs pro-angiogéniques. Cependant, l'augmentation du VEGF dans le plasma par rapport au groupe de

traitement continue (groupe E) est très importante (88 %). De plus, on a observé une augmentation significative du VEGF entre les groupes de traitements discontinus, groupe F par rapport au groupe D. Une augmentation significative du PIGF est également observée entre les groupes C et E. Ces résultats indiquent d'une part, que la tumeur est capable d'échapper au bevacizumab même après reprise du traitement, et d'autre part, que la durée du traitement et le schéma thérapeutique a un impact sur l'expression de ces facteurs pro-angiogéniques.

En revanche, nous n'avons pas observé le même effet sur la vascularisation tumorale par rapport au schéma 50J. Dans le groupe E, nous avons observé une augmentation de cellules desmine<sup>+</sup>. Dans le groupe F, nous avons observé une augmentation significative de cellules endothéliales (CD31<sup>+</sup>). Cette augmentation de cellules endothéliales est en corrélation avec la forte augmentation du VEGF. Nous avons également observé lors du suivi de la croissance tumorale, une tendance à la croissance tumorale plus rapide dans le groupe F, mais non significative par rapport au groupe E. Nous pensons que cela est dû au fait que dans les deux groupes de traitements, les tumeurs ont été capables de développer des moyens pour échapper au bevacizumab.

Deux conclusions peuvent être tirées de ces observations :

- 1) La levée de l'inhibition du VEGF par un traitement discontinu induit une forte activation de facteurs pro-angiogéniques, et par conséquent, une rapide reprise de la croissance tumorale
- 2) Lors d'un traitement prolongé au bevacizumab les tumeurs sont capables de développer une résistance qui leur permet d'échapper au traitement, mais le cas le plus défavorable reste le traitement discontinu.

Par ailleurs, plusieurs études cliniques ont montré, après arrêt d'un AAG ou durant une inter-cure, un rebond de la croissance tumorale et une rapide reprise de la vascularisation (Burstein et al. 2008; Arjan W. Griffioen et al. 2012). Cependant, des études précliniques ou cliniques, ont indiqué que la reprise de l'AAG entraînait à nouveau un contrôle de la croissance et de la vascularisation tumorale (Mancuso et al. 2006; Cacheux et al. 2008). Nous n'avons pas observé cet effet lors de la reprise du bevacizumab dans le groupe F. Cela peut être du au fait que l'arrêt du bevacizumab a entraîné une évolution des tumeurs à un stade où elles n'étaient

plus en mesure de répondre au traitement. Néanmoins de récentes études cliniques ont mis en évidence l'effet délétère de l'arrêt du bevacizumab en montrant que la maintenance de l'AAG augmente la SG des patients (Bennouna et al. 2013; "Maintenance Strategy with Fluoropyrimidines (FP) plus Bevacizumab (Bev), Bev Alone, or No Treatment, Following a Standard Combination of FP, Oxaliplatin (Ox), and Bev as First-Line Treatment for Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): A Phase III Non-Inferiority Trial (AIO KKK 0207)." 2015; Simkens et al. 2015).

Nous nous sommes intéressés à l'HGF pour ses propriétés pro-angiogéniques, prolifératives et son potentiel invasif. De plus, il a été montré que l'inhibition simultanée du VEGF et de MET (récepteur de l'HGF), inhibe l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la formation de métastases dans un modèle de cancer pancréatique (You et al. 2011; Sennino and McDonald 2012). De la même manière, nous nous sommes également intéressés au PlGF pour ses propriétés pro-angiogéniques. De plus, il a également été montré que l'inhibition du PlGF réduit la croissance tumorale (Fischer et al. 2007). Nos résultats confirment leur implication dans le mécanisme d'échappement au bevacizumab dans le cadre d'un traitement discontinu. Ces facteurs de croissances ont déjà été proposés comme cible thérapeutique potentielle. Nous pensons qu'il serait intéressant de tester en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement la prolongation de l'inhibition du VEGF et de cibler le PlGF et l'HGF.

Des molécules multi-cibles inhibant plusieurs facteurs pro-angiogéniques et favorisant la prolifération des cellules tumorales, afin de contrer les mécanismes de résistances ont déjà été développés. Néanmoins, même si la plupart ont échoué à apporter une amélioration par rapport aux traitements standards, certains comme le régorafénib ou l'aflibercept ont apporté un bénéfice sur la SG des patients.

Notre étude a également mis en évidence l'importance des péricytes dans la revascularisation tumorale. Nous savons que les péricytes jouent un rôle clé dans le maintien structurel, la maturation et la survie des cellules endothéliales. De plus, suite à la maturation des vaisseaux par le recrutement des péricytes, les vaisseaux tumoraux sont moins sensibles aux traitements anti-VEGF. L'importante augmentation des cellules desmine<sup>+</sup> (péricytes) observée lors de l'arrêt du bevacizumab (groupe D) serait donc impliquée dans le rebond de la croissance tumorale. En revanche, même si dans le schéma 70J, l'augmentation de péricytes est noté dans le groupe E par rapport au groupe F, on observe tout même une présence des péricytes. Cela explique davantage l'échappement au bevacizumab que l'on observe dans le groupe F

même après reprise du traitement. Par ailleurs, dans le groupe E, alors qu'une faible proportion de cellules CD31<sup>+</sup> (cellules endothéliales) est observée, des vaisseaux tumoraux marqués uniquement desmine<sup>+</sup> sont mis en évidence. En effet, sur les précédentes immunofluorescence nous observons les péricytes accolés autour des cellules endothéliales. Sur l'immunofluorescence du groupe E, on distingue clairement des vaisseaux formés uniquement de cellules desmine<sup>+</sup> (péricytes). Par conséquent, lorsque le VEGF est inhibé, les péricytes sont capables de prendre le relais et d'induire une néo-vascularisation tumorale. Ainsi, le ciblage des péricytes est un élément majeur des traitements AAG et l'utilisation de molécules ITK ciblant à la fois le VEGF et le PDGF est particulièrement intéressante. Cela pourrait donc expliquer les bénéfices obtenus des ITK tels que l'axitinib ou le pazopanib.

Nous nous sommes par ailleurs intéressé à une récente théorie selon laquelle les CSC sont directement responsables du développement tumoral. Comme les traitements actuels ne ciblant pas les CSC, elles seraient caractérisées par une résistance accrue à ces thérapies et seraient par conséquent, responsables des rechutes après une première période de rémission. L'analyse de 2 sous-populations de CSC nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative de ces CSC dans les groupes de traitements discontinus (groupe D et F) par rapport aux groupes continus (groupe C et E, respectivement). Ces résultats indiquent que ces cellules sont également impliquées dans la rapide reprise de la croissance tumorale. L'augmentation semble plus importante dans le groupe discontinu F, ce qui indiquerait une forte implication des CSC dans l'échappement au bevacizumab après reprise du traitement et par conséquent dans les rechutes tumorales. Inversement, et de manière inattendue, l'inhibition continue du VEGF semble avoir un effet bénéfique à long terme sur les CSC.

Par ailleurs, lors de l'analyse des CSC par cytométrie en flux, nous avons également procédé à un tri cellulaire. Nous avons tenté de mettre en culture les 2 sous-populations de CSC afin d'avoir un nombre suffisant de cellules pour pouvoir quantifier la glycoprotéine-P (transporteur ABC : exporte les médicaments) et mettre en évidence l'implication de ce transporteur dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. Malheureusement, comme les CSC constituent qu'une petite fraction de la population tumorale, nous n'avons réussi à avoir qu'une faible quantité de ces cellules (de l'ordre de 200 à 2000 CSC selon les tumeurs) et avons échoué à les mettre en culture.

Le dosage de HIF-1 $\alpha$  n'a permis de mettre en évidence qu'une diminution significative entre le groupe F par rapport au groupe E. Cependant, on observe une forte présence de HIF-1 $\alpha$  dans le schéma 30J avec des taux plus faible pour les schémas 50J et 70J. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que lors du schéma 30J, le traitement court au bevacizumab, a eu comme effet de fortement ralentir la néo-vascularisation tumorale et par conséquent une forte hypoxie s'est installée au sein des tumeurs. Dans le cas des traitements plus long, schéma 50J (groupe D) et 70J (groupe E et F), on a observé une forte reprise de la néo-vascularisation tumorale. Cette hypoxie a probablement entraîné l'accélération de la vascularisation tumorale, qui à son tour a induit une baisse d'HIF-1 $\alpha$  (par l'apport d'O<sub>2</sub>). Sachant l'implication d'HIF-1 $\alpha$  dans l'activation des facteurs pro-angiogéniques et l'augmentation des CSC, une corrélation a pu être observée entre nos résultats. Nous posons donc l'hypothèse que les différents échecs observés en clinique pour prévenir les mécanismes de résistances sont probablement dus au fait qu'il faille cibler l'élément déclencheur de tout ces mécanismes, l'hypoxie intra-tumorale. Plusieurs études sont actuellement en cours pour développer un traitement.

Cependant, une autre question se pose, en quoi l'arrêt ou une inter-cure est responsable de l'augmentation des CSC ? Une étude a montré sur deux lignées de cancer métastatique du sein humain, que des cycles d'hypoxie/réoxygénation entraînaient une sélection et augmentation de CSC (Louie et al. 2010). Les CSC seraient donc plus résistantes à une instabilité du microenvironnement tumoral.

Un dernier mécanisme de résistance aux AAG a été analysé, celui du recrutement de cellules pro-angiogéniques dérivées de la moelle osseuse. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux CEP car ces cellules auraient la capacité de s'incorporer aux vaisseaux en formation, où elles se différencient en cellules endothéliales matures. De plus, il a été montré que des thérapies AAG favorisent le recrutement de ces cellules au sein des tumeurs (Shaked et al. 2006). Nous nous sommes donc demandés si les CEP, lors d'une résistance aux AAG dans le cadre d'un traitement discontinu, participaient à la néo-vascularisation tumorale. Les résultats obtenus ne montrent aucun signe d'implication des CEP dans la néo-vascularisation tumorale, puisque aucune différence n'a été observée entre les groupes continus et discontinus. Cette observation est valable pour les CEP et son effecteur SDF-1 $\alpha$ .

Pour la deuxième partie de ce travail, seul le troisième article sera discuté étant donné que le deuxième article est une revue présentant le modèle animal utilisé dans la suite du travail. Ce troisième article nous a permis de confirmer un constat clinique. En effet, dans cette dernière étude nous avons pu mettre en évidence dans un modèle animal mimant la maladie humaine que l'association du bevacizumab à une chimiothérapie standard en situation adjuvante accélère la croissance tumorale.

Afin d'obtenir des résultats les plus pertinents possibles, nous avons réalisé cette étude avec deux xénogreffes tumorales, présentant un profil phénotypique différent. Nous avons principalement observé des récidives locales et nodules péritonéaux comme manifestation cancéreuse. En effet, ces récidives locales et nodules péritonéaux ont été observés uniquement dans les bras de traitement bevacizumab et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine pour la xénogreffe CR-IGR-0014P et les bras de traitement contrôle, bevacizumab et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine pour la xénogreffe CR-IGR-0009P. Cependant, ces récidives locales et nodules péritonéaux étaient plus nombreux dans les bras de traitement comportant le bevacizumab (en monothérapie ou associée à la chimiothérapie). De plus, nous avons observé dans le bras de traitement bevacizumab, dans le groupe A, une métastase hépatique dans chacune des xénogreffes tumorales ainsi qu'une métastase ganglionnaire dans le groupe B de la xénogreffe CR-IGR-0009P. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence une accélération de l'évolution tumorale dans les bras de traitement comportant le bevacizumab dès l'autopsie.

Le dosage de facteurs pro-angiogéniques a permis de mettre en évidence une diminution significative des facteurs pro-angiogéniques pour les souris traitées au bevacizumab (en monothérapie ou associée à la chimiothérapie). Pour le VEGF cette diminution est observée entre les bras de traitement contrôle et bevacizumab, et les bras de traitement contrôle et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine, dans les 2 xénogreffes tumorales et dans les groupes A et B. Une diminution du VEGF entre les bras de traitements 5-FU/oxaliplatine et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine est observée uniquement dans le groupe B (dans les 2 xénogreffes tumorales). Ces résultats indiquent que même après arrêt du bevacizumab une diminution du VEGF peut toujours être observée, ceci est probablement dû à la longue demi-vie du bevacizumab qui est d'environ 20 jours. Concernant le dosage du PlGF et de l'HGF, on observe toujours cette même diminution entre les bras de traitement contrôle et bevacizumab/5-FU/oxaliplatine, dans les 2 xénogreffes tumorales et dans les groupes A et B. Ces résultats

semblent indiquer un effet synergique entre la chimiothérapie et le bevacizumab. Néanmoins, le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui inhibe spécifiquement le VEGF-A et nous avons tout de même observé une diminution des facteurs de croissance PlGF et HGF. Le bevacizumab induit probablement un effet systémique, entraînant un remodelage vasculaire. Ceci a d'ailleurs déjà été observé dans une étude sur des patients traités au bevacizumab, au niveau de la peau d'une diminution du nombre de capillaires (Mourad et al. 2008).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la non-efficacité de cette association de traitement en situation adjuvante :

- 1) possibilité que le bevacizumab induise « la dormance » des cellules tumorales plus que leur mort, ce qui pourrait les protéger de l'action de la chimiothérapie et l'arrêt de l'AAG favoriserait la prolifération de ces cellules et la progression tumorale.
- 2) possibilité d'un changement des caractéristiques de la maladie, qui deviendrait plus agressive et moins dépendante des facteurs pro-angiogéniques
- 3) l'hypoxie induite par les AAG, pourrait être responsable d'une inflammation importante favorisant la croissance tumorale.

L'hypothèse de dormance avait été proposée suite à un effet bénéfique transitoire du bevacizumab observé dans l'essai C-08, alors qu'aucune tendance de ce type n'a été observée dans l'essai AVANT. De plus, cette hypothèse n'est pas valide dans notre cas car nous avons observé une progression tumorale alors que les souris étaient toujours traitées au bevacizumab (groupe A). En revanche, les changements moléculaires observés ont probablement entraîné les rechutes tumorales avec un phénotype plus agressif moins dépendant des facteurs pro-angiogéniques. De la même manière, l'hypoxie induite par le bevacizumab a sans doute induit l'activation de mécanismes favorisant la croissance tumorale.

Deux observations ont également été faites dans le présent travail. La première concerne l'efficacité de la chimiothérapie à prévenir les rechutes tumorales et la formation de métastases, en traitement complémentaire à la chirurgie (traitement adjuvant). En effet, aucune rechute n'a été observée dans notre modèle pour les souris traitées au 5-FU/oxaliplatine pour les 2 xénogreffes tumorales et dans les 2 groupes. La seconde a trait à la baisse significative des facteurs pro-angiogéniques qui semble certes délétère en situation

adjuvante mais pourrait largement expliquer l'effet bénéfique pour les patients atteints de cancer métastatique. Ainsi, en situation adjuvante la maladie est au stade micrométastatique et avasculaire (les micrométastases n'ayant pas besoin de néo-angiogenèse pour survivre), la cible est donc absente. En revanche, au stade métastatique le cancer est fortement vascularisé et ces facteurs pro-angiogéniques sont surexprimés.

Finalement, même si les résultats obtenus nous permettent de conclure à une accélération de la rechute du cancer pour l'adjonction du bevacizumab en traitement adjuvant, nous avons tout de même observé moins de métastase qu'attendue. Par ailleurs, nous avons tenté de quantifier des cellules tumorales dans le foie des souris par PCR quantitative. Nous avons également réalisé une étude cinétique des cellules tumorales circulantes (collaboration avec l'Institut Curie, Paris). La quantification a permis de montrer une augmentation non significative de cellules tumorales humaines dans le foie dans le bras de traitement bevacizumab par rapport au bras contrôle (CR-IGR-0009P, groupe A). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à détecter de cellules tumorales dans les tissus hépatiques. De la même manière, nous avons détecté quelques cellules tumorales circulantes durant le suivi de la cinétique, mais les résultats n'étant ni suffisants ni homogènes, nous ne pouvons les exploiter. Cette disparité dans la détection de cellules tumorales humaines (dans le foie ou circulantes) peut être due à un défaut technique de détection ou bien à la sélection de clones moins métastatisant par les différents passages sous-cutanés sur souris. Cette dernière pourrait également expliquer le faible taux de métastases observé.

Nous espérons avoir davantage de matières à exploiter lors de la quantification des vaisseaux hépatiques des souris par immunofluorescence. Ceci pourrait nous permettre de savoir s'il y a un éventuel lien entre un remodelage vasculaire par les AAG et une apparition de métastases. De plus, une analyse du remodelage de la MEC au niveau des récurrences locales et des nodules péritonéaux sera réalisée en dosant des métalloprotéases et HIF-1 $\alpha$ . Ceci, afin de mettre en évidence s'il y a d'une part, un remodelage de la MEC lors d'un traitement au bévacizumab et s'il y a d'autre part une corrélation avec l'apparition de métastases.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



L'utilisation pertinente des traitements AAG soulève de nombreuses questions, concernant en particulier leur efficacité modeste en terme de survie et les observations décevantes de résistance et de progression tumorale. La néo-angiogenèse tumorale implique principalement et en premier lieu la voie du VEGF. Cependant, des voies alternatives peuvent intervenir et prendre le relais lors de l'inhibition du VEGF pour permettre la croissance tumorale. L'inhibition de ces différents éléments constitue donc un enjeu majeur. Cet objectif est complexe, les signaux pro- et anti-angiogéniques étant finement régulés par divers stimuli et l'intervention de corécepteurs, les nombreuses interactions et redondances fonctionnelles entre les différents acteurs de cette voie peuvent probablement expliquer pourquoi les tentatives de cibler plusieurs voies n'ont pour l'instant pas apporté d'amélioration sur la SG des patients. Il semblerait donc préférable de tester les AAG en association avec un traitement ciblant des éléments les plus en amont ou impliqués dans le déclenchement des mécanismes de résistances, tels que l'HIF-1 $\alpha$ . L'hypothèse des CSC reste encore controversée, cependant, nos résultats mettent en évidence une importante implication des CSC dans la rechute du cancer et par conséquent, dans la résistance aux AAG. Alors que cette théorie n'a toujours pas été intégrée aux études cliniques, il semble important de prendre en compte ces CSC comme nouvelle cible thérapeutique. L'enjeu majeur reste de trouver des propriétés des CSC différentes de celles des cellules souches normales pour les cibler spécifiquement.

Nos résultats permettent également de confirmer que le bevacizumab ne semble pas constitué un traitement adjuvant. De plus notre travail souligne l'importance d'évaluer tout effet thérapeutique d'un traitement sur un modèle animal au préalable.

L'ensemble de nos résultats confirme que l'efficacité du bevacizumab et probablement les autres AAG, dépend du stade de la maladie, du schéma thérapeutique et de la durée du traitement. La tendance est actuellement au développement de thérapies personnalisées en fonction des caractéristiques spécifiques des patients. En revanche, alors que les AAG sont sur le marché depuis plus de dix ans, aucun biomarqueur prédictif d'efficacité n'est actuellement validé. Et pourtant, l'utilisation des biomarqueurs prédictifs est indispensable pour une meilleure prise en charge des patients. Les efforts doivent être poursuivis afin d'identifier des biomarqueurs en clinique et de permettre une évaluation simple et rapide de l'efficacité d'un traitement avant de le prescrire aux patients.



# **BIBLIOGRAPHIE**



- Aase, K., A. Lymboussaki, A. Kaipainen, B. Olofsson, K. Alitalo, and U. Eriksson. 1999. "Localization of VEGF-B in the Mouse Embryo Suggests a Paracrine Role of the Growth Factor in the Developing Vasculature." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 215 (1): 12–25. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199905)215:1<12::AID-DVDY3>3.0.CO;2-N.
- Abdul Khalek, Feras J., G. Ian Gallicano, and Lopa Mishra. 2010. "Colon Cancer Stem Cells." *Gastrointestinal Cancer Research: GCR*, no. Suppl 1 (November): S16–23.
- Agarwal, Neeraj, Guru Sonpavde, and Cora N. Sternberg. 2012. "Novel Molecular Targets for the Therapy of Castration-Resistant Prostate Cancer." *European Urology* 61 (5): 950–60. doi:10.1016/j.eururo.2011.12.028.
- Alberts, Steven R., Daniel J. Sargent, Suresh Nair, Michelle R. Mahoney, Margaret Mooney, Stephen N. Thibodeau, Thomas C. Smyrk, et al. 2012. "Effect of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin with or without Cetuximab on Survival among Patients with Resected Stage III Colon Cancer: A Randomized Trial." *JAMA* 307 (13): 1383–93. doi:10.1001/jama.2012.385.
- Alessi, Patrizia, Daria Leali, Maura Camozzi, Annarita Cantelmo, Adriana Albini, and Marco Presta. 2009. "Anti-FGF2 Approaches as a Strategy to Compensate Resistance to Anti-VEGF Therapy: Long-Pentraxin 3 as a Novel Antiangiogenic FGF2-Antagonist." *European Cytokine Network* 20 (4): 225–34. doi:10.1684/ecn.2009.0175.
- Allegra, Carmen J., Greg Yothers, Michael J. O'Connell, Saima Sharif, Nicholas J. Petrelli, Linda H. Colangelo, James N. Atkins, et al. 2011. "Phase III Trial Assessing Bevacizumab in Stages II and III Carcinoma of the Colon: Results of NSABP Protocol C-08." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (1): 11–16. doi:10.1200/JCO.2010.30.0855.
- Anderson, Eric C., Crystal Hessman, Trevor G. Levin, Marcus M. Monroe, and Melissa H. Wong. 2011. "The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response." *Cancers* 3 (1): 319–39. doi:10.3390/cancers3010319.
- André, T., C. Louvet, F. Maindrault-Goebel, C. Couteau, M. Mabro, J. P. Lotz, V. Gilles-Amar, et al. 1999. "CPT-11 (irinotecan) Addition to Bimonthly, High-Dose Leucovorin and Bolus and Continuous-Infusion 5-Fluorouracil (FOLFIRI) for Pretreated Metastatic Colorectal Cancer. GERCOR." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 35 (9): 1343–47.
- "A Randomized, Double-Blind, Phase II Study of First-Line FOLFOX plus Bevacizumab with Onartuzumab versus Placebo in Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC)." 2015. *Journal of Clinical Oncology*. Accessed September 6. <http://meetinglibrary.asco.org/content/140358-158>.

- Arteaga, Carlos L. 2003. "ErbB-Targeted Therapeutic Approaches in Human Cancer." *Experimental Cell Research* 284 (1): 122–30.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner. 1997. "Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302): 964–67.
- Bachelder, R. E., A. Crago, J. Chung, M. A. Wendt, L. M. Shaw, G. Robinson, and A. M. Mercurio. 2001. "Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Neuropilin-Expressing Breast Carcinoma Cells." *Cancer Research* 61 (15): 5736–40.
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, and D. Marmé. 1996. "Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor Flt-1." *Blood* 87 (8): 3336–43.
- Barr, M. P., A. M. Byrne, A. M. Duffy, C. M. Condrón, M. Devocelle, P. Harriott, D. J. Bouchier-Hayes, and J. H. Harmey. 2005. "A Peptide Corresponding to the Neuropilin-1-Binding Site on VEGF(165) Induces Apoptosis of Neuropilin-1-Expressing Breast Tumour Cells." *British Journal of Cancer* 92 (2): 328–33. doi:10.1038/sj.bjc.6602308.
- Batchelor, Tracy T., Elizabeth R. Gerstner, Kyrre E. Emblem, Dan G. Duda, Jayashree Kalpathy-Cramer, Matija Snuderl, Marek Ancukiewicz, et al. 2013. "Improved Tumor Oxygenation and Survival in Glioblastoma Patients Who Show Increased Blood Perfusion after Cediranib and Chemoradiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (47): 19059–64. doi:10.1073/pnas.1318022110.
- Batchelor, Tracy T., A. Gregory Sorensen, Emmanuelle di Tomaso, Wei-Ting Zhang, Dan G. Duda, Kenneth S. Cohen, Kevin R. Kozak, et al. 2007. "AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients." *Cancer Cell* 11 (1): 83–95. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.021.
- Bates, David O., Tai-Gen Cui, Joanne M. Doughty, Matthias Winkler, Marto Sugiono, Jacqueline D. Shields, Danielle Peat, David Gillatt, and Steven J. Harper. 2002. "VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is down-Regulated in Renal Cell Carcinoma." *Cancer Research* 62 (14): 4123–31.
- Beierle, Elizabeth A., Wei Dai, Max R. Langham, Edward M. Copeland, and Mike K. Chen. 2004. "Expression of VEGF Receptors in Cocultured Neuroblastoma Cells." *The Journal of Surgical Research* 119 (1): 56–65. doi:10.1016/j.jss.2004.01.002.
- Benjamin, L. E., I. Hemo, and E. Keshet. 1998. "A Plasticity Window for Blood Vessel Remodelling Is Defined by Pericyte Coverage of the Preformed Endothelial Network and Is Regulated by PDGF-B and VEGF." *Development (Cambridge, England)* 125 (9): 1591–98.

- Bennouna, Jaafar, Javier Sastre, Dirk Arnold, Pia Österlund, Richard Greil, Eric Van Cutsem, Roger von Moos, et al. 2013. "Continuation of Bevacizumab after First Progression in Metastatic Colorectal Cancer (ML18147): A Randomised Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 14 (1): 29–37. doi:10.1016/S1470-2045(12)70477-1.
- Bergers, Gabriele, and Douglas Hanahan. 2008. "Modes of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 8 (8): 592–603. doi:10.1038/nrc2442.
- Bergers, Gabriele, Steven Song, Nicole Meyer-Morse, Emily Bergsland, and Douglas Hanahan. 2003. "Benefits of Targeting Both Pericytes and Endothelial Cells in the Tumor Vasculature with Kinase Inhibitors." *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9): 1287–95. doi:10.1172/JCI17929.
- Bertolini, Francesco, Yuval Shaked, Patrizia Mancuso, and Robert S. Kerbel. 2006. "The Multifaceted Circulating Endothelial Cell in Cancer: Towards Marker and Target Identification." *Nature Reviews. Cancer* 6 (11): 835–45. doi:10.1038/nrc1971.
- Betsholtz, Christer. 2004. "Insight into the Physiological Functions of PDGF through Genetic Studies in Mice." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (4): 215–28. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.005.
- Birchmeier, Carmen, Walter Birchmeier, Ermanno Gherardi, and George F. Vande Woude. 2003. "Met, Metastasis, Motility and More." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (12): 915–25. doi:10.1038/nrm1261.
- Bishop, J. M. 1991. "Molecular Themes in Oncogenesis." *Cell* 64 (2): 235–48.
- Bjerknes, Matthew, and Hazel Cheng. 2005. "Gastrointestinal Stem Cells. II. Intestinal Stem Cells." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 289 (3): G381–87. doi:10.1152/ajpgi.00160.2005.
- Boehm, T., J. Folkman, T. Browder, and M. S. O'Reilly. 1997. "Antiangiogenic Therapy of Experimental Cancer Does Not Induce Acquired Drug Resistance." *Nature* 390 (6658): 404–7. doi:10.1038/37126.
- Bokemeyer, C., I. Bondarenko, J. T. Hartmann, F. de Braud, G. Schuch, A. Zubel, I. Celik, M. Schlichting, and P. Koralewski. 2011. "Efficacy according to Biomarker Status of Cetuximab plus FOLFOX-4 as First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The OPUS Study." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22 (7): 1535–46. doi:10.1093/annonc/mdq632.
- Boland, C. Richard, and Ajay Goel. 2010. "Microsatellite Instability in Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 138 (6): 2073–87.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- Boman, Bruce M., and Emina Huang. 2008. "Human Colon Cancer Stem Cells: A New Paradigm in Gastrointestinal Oncology." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal*

*of the American Society of Clinical Oncology* 26 (17): 2828–38.  
doi:10.1200/JCO.2008.17.6941.

- Bonnet, C. S., and D. A. Walsh. 2005. "Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation." *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (1): 7–16. doi:10.1093/rheumatology/keh344.
- Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. "Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell." *Nature Medicine* 3 (7): 730–37.
- Brabletz, S., O. Schmalhofer, and T. Brabletz. 2009. "Gastrointestinal Stem Cells in Development and Cancer." *The Journal of Pathology* 217 (2): 307–17. doi:10.1002/path.2475.
- Bray, Freddie, Ahmedin Jemal, Nathan Grey, Jacques Ferlay, and David Forman. 2012. "Global Cancer Transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A Population-Based Study." *The Lancet. Oncology* 13 (8): 790–801. doi:10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- Broholm, H., and H. Laursen. 2004. "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Neuropilin-1's Distribution in Astrocytic Tumors." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 112 (4-5): 257–63. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11204-0505.x.
- Buczacki, S., R. J. Davies, and D. J. Winton. 2011. "Stem Cells, Quiescence and Rectal Carcinoma: An Unexplored Relationship and Potential Therapeutic Target." *British Journal of Cancer* 105 (9): 1253–59. doi:10.1038/bjc.2011.362.
- Burstein, Harold J., Anthony D. Elias, Hope S. Rugo, Melody A. Cobleigh, Antonio C. Wolff, Peter D. Eisenberg, Mary Lehman, et al. 2008. "Phase II Study of Sunitinib Malate, an Oral Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients with Metastatic Breast Cancer Previously Treated with an Anthracycline and a Taxane." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (11): 1810–16. doi:10.1200/JCO.2007.14.5375.
- Cacheux, W., T. Boisserie, L. Staudacher, O. Vignaux, B. Dousset, O. Soubrane, B. Terris, C. Mateus, S. Chaussade, and F. Goldwasser. 2008. "Reversible Tumor Growth Acceleration Following Bevacizumab Interruption in Metastatic Colorectal Cancer Patients Scheduled for Surgery." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19 (9): 1659–61. doi:10.1093/annonc/mdn540.
- Cainap, Calin, Shukui Qin, Wen-Tsung Huang, Ik Joo Chung, Hongming Pan, Ying Cheng, Masatoshi Kudo, et al. 2015. "Linifanib versus Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (2): 172–79.

doi:10.1200/JCO.2013.54.3298.

- Cao, Yihai, and Qi Liu. 2007. "Therapeutic Targets of Multiple Angiogenic Factors for the Treatment of Cancer and Metastasis." *Advances in Cancer Research* 97: 203–24. doi:10.1016/S0065-230X(06)97009-2.
- Carmeliet, Peter. 2003. "Angiogenesis in Health and Disease." *Nature Medicine* 9 (6): 653–60. doi:10.1038/nm0603-653.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. 2011. "Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis." *Nature* 473 (7347): 298–307. doi:10.1038/nature10144.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, et al. 1996. "Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele." *Nature* 380 (6573): 435–39. doi:10.1038/380435a0.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2000. "Angiogenesis in Cancer and Other Diseases." *Nature* 407 (6801): 249–57. doi:10.1038/35025220.
- Carmeliet, P., L. Moons, A. Luttun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, et al. 2001. "Synergism between Vascular Endothelial Growth Factor and Placental Growth Factor Contributes to Angiogenesis and Plasma Extravasation in Pathological Conditions." *Nature Medicine* 7 (5): 575–83. doi:10.1038/87904.
- Carroll, Veronica A., and Margaret Ashcroft. 2005. "Targeting the Molecular Basis for Tumour Hypoxia." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7 (6): 1–16. doi:10.1017/S1462399405009117.
- Casanovas, Oriol, Daniel J. Hicklin, Gabriele Bergers, and Douglas Hanahan. 2005a. "Drug Resistance by Evasion of Antiangiogenic Targeting of VEGF Signaling in Late-Stage Pancreatic Islet Tumors." *Cancer Cell* 8 (4): 299–309. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005.
- . 2005b. "Drug Resistance by Evasion of Antiangiogenic Targeting of VEGF Signaling in Late-Stage Pancreatic Islet Tumors." *Cancer Cell* 8 (4): 299–309. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005.
- Cascone, Tina, Matthew H. Herynk, Li Xu, Zhiqiang Du, Humam Kadara, Monique B. Nilsson, Carol J. Oborn, et al. 2011. "Upregulated Stromal EGFR and Vascular Remodeling in Mouse Xenograft Models of Angiogenesis Inhibitor-Resistant Human Lung Adenocarcinoma." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1313–28. doi:10.1172/JCI42405.
- Ceradini, Daniel J., Anita R. Kulkarni, Matthew J. Callaghan, Oren M. Tepper, Nicholas Bastidas, Mark E. Kleinman, Jennifer M. Capla, Robert D. Galiano, Jamie P. Levine, and Geoffrey C. Gurtner. 2004. "Progenitor Cell Trafficking Is Regulated by Hypoxic Gradients through HIF-1 Induction of SDF-1." *Nature Medicine* 10 (8): 858–64.

doi:10.1038/nm1075.

- Christinger, Hans W., Germaine Fuh, Abraham M. de Vos, and Christian Wiesmann. 2004. "The Crystal Structure of Placental Growth Factor in Complex with Domain 2 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 10382–88. doi:10.1074/jbc.M313237200.
- Chung, Alicia S., Marcin Kowanetz, Xiumin Wu, Guanglei Zhuang, Hai Ngu, David Finkle, Laszlo Komuves, Franklin Peale, and Napoleone Ferrara. 2012. "Differential Drug Class-Specific Metastatic Effects Following Treatment with a Panel of Angiogenesis Inhibitors." *The Journal of Pathology* 227 (4): 404–16. doi:10.1002/path.4052.
- Cleaver, Ondine, and Douglas A. Melton. 2003. "Endothelial Signaling during Development." *Nature Medicine* 9 (6): 661–68. doi:10.1038/nm0603-661.
- Conley, Sarah J., Elizabeth Gheordunescu, Pramod Kakarala, Bryan Newman, Hasan Korkaya, Amber N. Heath, Shawn G. Clouthier, and Max S. Wicha. 2012. "Antiangiogenic Agents Increase Breast Cancer Stem Cells via the Generation of Tumor Hypoxia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8): 2784–89. doi:10.1073/pnas.1018866109.
- Covello, Kelly L., M. Celeste Simon, and Brian Keith. 2005. "Targeted Replacement of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha by a Hypoxia-Inducible Factor-2alpha Knock-in Allele Promotes Tumor Growth." *Cancer Research* 65 (6): 2277–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3246.
- Cross, Michael J., Johan Dixelius, Taro Matsumoto, and Lena Claesson-Welsh. 2003. "VEGF-Receptor Signal Transduction." *Trends in Biochemical Sciences* 28 (9): 488–94. doi:10.1016/S0968-0004(03)00193-2.
- Dalerba, Piero, Scott J. Dylla, In-Kyung Park, Rui Liu, Xinhao Wang, Robert W. Cho, Timothy Hoey, et al. 2007. "Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10158–63. doi:10.1073/pnas.0703478104.
- David, Laurent, Christine Mallet, Michelle Keramidas, Noël Lamandé, Jean-Marie Gasc, Sophie Dupuis-Girod, Henri Plauchu, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. 2008. "Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Circulating Vascular Quiescence Factor." *Circulation Research* 102 (8): 914–22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165530.
- De Gramont, Aimery, Eric Van Cutsem, Hans-Joachim Schmoll, Josep Tabernero, Stephen Clarke, Malcolm J. Moore, David Cunningham, et al. 2012. "Bevacizumab plus Oxaliplatin-Based Chemotherapy as Adjuvant Treatment for Colon Cancer (AVANT): A Phase 3 Randomised Controlled Trial." *The Lancet. Oncology* 13 (12): 1225–33. doi:10.1016/S1470-2045(12)70509-0.

- Demetri, George D., Peter Reichardt, Yoon-Koo Kang, Jean-Yves Blay, Piotr Rutkowski, Hans Gelderblom, Peter Hohenberger, et al. 2013. "Efficacy and Safety of Regorafenib for Advanced Gastrointestinal Stromal Tumours after Failure of Imatinib and Sunitinib (GRID): An International, Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 381 (9863): 295–302. doi:10.1016/S0140-6736(12)61857-1.
- Dick, John E. 2008. "Stem Cell Concepts Renew Cancer Research." *Blood* 112 (13): 4793–4807. doi:10.1182/blood-2008-08-077941.
- Diéras, V., M. Campone, D. A. Yardley, G. Romieu, V. Valero, S. J. Isakoff, H. Koeppen, et al. 2015. "Randomized, Phase II, Placebo-Controlled Trial of Onartuzumab And/or Bevacizumab in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26 (9): 1904–10. doi:10.1093/annonc/mdv263.
- Ding, H., X. Wu, L. Roncari, N. Lau, P. Shannon, A. Nagy, and A. Guha. 2000. "Expression and Regulation of Neuropilin-1 in Human Astrocytomas." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 88 (4): 584–92.
- Dixelius, Johan, Taija Makinen, Maria Wirzenius, Marika J. Karkkainen, Christer Wernstedt, Kari Alitalo, and Lena Claesson-Welsh. 2003. "Ligand-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) Heterodimerization with VEGFR-2 in Primary Lymphatic Endothelial Cells Regulates Tyrosine Phosphorylation Sites." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (42): 40973–79. doi:10.1074/jbc.M304499200.
- Djonov, Valentin, Oliver Baum, and Peter H. Burri. 2003. "Vascular Remodeling by Intussusceptive Angiogenesis." *Cell and Tissue Research* 314 (1): 107–17. doi:10.1007/s00441-003-0784-3.
- Dumont, D. J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman, and K. Alitalo. 1998. "Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5390): 946–49.
- Du, Rose, Kan V. Lu, Claudia Petritsch, Patty Liu, Ruth Ganss, Emmanuelle Passegué, Hanqiu Song, et al. 2008. "HIF1alpha Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion." *Cancer Cell* 13 (3): 206–20. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.034.
- Dvorak, Harold F. 2002. "Vascular Permeability Factor/vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (21): 4368–80.
- Ebos, John M. L., and Robert S. Kerbel. 2011. "Antiangiogenic Therapy: Impact on Invasion, Disease Progression, and Metastasis." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8 (4): 210–

21. doi:10.1038/nrclinonc.2011.21.

Ebos, John M. L., Christina R. Lee, William Cruz-Munoz, Georg A. Bjarnason, James G. Christensen, and Robert S. Kerbel. 2009a. "Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis." *Cancer Cell* 15 (3): 232–39. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021.

———. 2009b. "Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis." *Cancer Cell* 15 (3): 232–39. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021.

Ebos, John M. L., Christina R. Lee, and Robert S. Kerbel. 2009. "Tumor and Host-Mediated Pathways of Resistance and Disease Progression in Response to Antiangiogenic Therapy." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (16): 5020–25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0095.

Eisen, Tim, Stéphane Oudard, Cezary Szczylik, Gwenaëlle Gravis, Hans Heinzer, Richard Middleton, Frank Cihon, et al. 2008. "Sorafenib for Older Patients with Renal Cell Carcinoma: Subset Analysis from a Randomized Trial." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (20): 1454–63. doi:10.1093/jnci/djn319.

Ellis, Lee M. 2006. "The Role of Neuropilins in Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (5): 1099–1107. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0538.

Ellis, Lee M., and Daniel J. Hicklin. 2008. "Pathways Mediating Resistance to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (20): 6371–75. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5287.

Ellis, Peter M., and Khalid Al-Saleh. 2012. "Multitargeted Anti-Angiogenic Agents and NSCLC: Clinical Update and Future Directions." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 84 (1): 47–58. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.02.004.

Enholm, Susa, Tuija Hienonen, Anu Suomalainen, Lara Lipton, Ian Tomlinson, Vesa Kärjä, Matti Eskelinen, et al. 2003. "Proportion and Phenotype of MYH-Associated Colorectal Neoplasia in a Population-Based Series of Finnish Colorectal Cancer Patients." *The American Journal of Pathology* 163 (3): 827–32. doi:10.1016/S0002-9440(10)63443-8.

Eriksson, Anna, Renhai Cao, Robert Pawliuk, Sanna Maria Berg, Monica Tsang, Danielle Zhou, Christina Fleet, et al. 2002. "Placenta Growth Factor-1 Antagonizes VEGF-Induced Angiogenesis and Tumor Growth by the Formation of Functionally Inactive PlGF-1/VEGF Heterodimers." *Cancer Cell* 1 (1): 99–108.

Escudier, Bernard, Tim Eisen, Walter M. Stadler, Cezary Szczylik, Stéphane Oudard, Michael Staehler, Sylvie Negrier, et al. 2009. "Sorafenib for Treatment of Renal Cell Carcinoma:

- Final Efficacy and Safety Results of the Phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (20): 3312–18. doi:10.1200/JCO.2008.19.5511.
- Escudier, Bernard, Anna Pluzanska, Piotr Koralewski, Alain Ravaud, Sergio Bracarda, Cezary Szczylik, Christine Chevreau, et al. 2007. "Bevacizumab plus Interferon Alfa-2a for Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Randomised, Double-Blind Phase III Trial." *Lancet (London, England)* 370 (9605): 2103–11. doi:10.1016/S0140-6736(07)61904-7.
- Escudier, Bernard, Jan Roigas, Silke Gillessen, Ulrika Harmenberg, Sandhya Srinivas, Sasja F. Mulder, George Fountzilias, et al. 2009. "Phase II Study of Sunitinib Administered in a Continuous Once-Daily Dosing Regimen in Patients with Cytokine-Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (25): 4068–75. doi:10.1200/JCO.2008.20.5476.
- Fan, Fan, Jane S. Wey, Marya F. McCarty, Anna Belcheva, Wenbiao Liu, Todd W. Bauer, Ray J. Somcio, et al. 2005. "Expression and Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 on Human Colorectal Cancer Cells." *Oncogene* 24 (16): 2647–53. doi:10.1038/sj.onc.1208246.
- Fan, F., S. Samuel, P. Gaur, J. Lu, N. A. Dallas, L. Xia, D. Bose, V. Ramachandran, and L. M. Ellis. 2011. "Chronic Exposure of Colorectal Cancer Cells to Bevacizumab Promotes Compensatory Pathways That Mediate Tumour Cell Migration." *British Journal of Cancer* 104 (8): 1270–77. doi:10.1038/bjc.2011.81.
- Fearon, Eric R. 2011. "Molecular Genetics of Colorectal Cancer." *Annual Review of Pathology* 6: 479–507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
- Ferrara, Napoleone, Kenneth J. Hillan, and William Novotny. 2005. "Bevacizumab (Avastin), a Humanized Anti-VEGF Monoclonal Antibody for Cancer Therapy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (2): 328–35. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.132.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, and M. W. Moore. 1996. "Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inactivation of the VEGF Gene." *Nature* 380 (6573): 439–42. doi:10.1038/380439a0.
- Fischer, Christian, Bart Jonckx, Massimiliano Mazzone, Serena Zacchigna, Sonja Loges, Lucia Pattarini, Emmanuel Chorianopoulos, et al. 2007. "Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels." *Cell* 131 (3):

463–75. doi:10.1016/j.cell.2007.08.038.

Fischer, Christian, Massimiliano Mazzone, Bart Jonckx, and Peter Carmeliet. 2008. “FLT1 and Its Ligands VEGFB and PlGF: Drug Targets for Anti-Angiogenic Therapy?” *Nature Reviews. Cancer* 8 (12): 942–56. doi:10.1038/nrc2524.

Folkman, J. 1971. “Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications.” *The New England Journal of Medicine* 285 (21): 1182–86. doi:10.1056/NEJM197111182852108.

———. 1990. “What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?” *Journal of the National Cancer Institute* 82 (1): 4–6.

———. 1995. “Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease.” *Nature Medicine* 1 (1): 27–31.

Folkman, J., and D. Ingber. 1992. “Inhibition of Angiogenesis.” *Seminars in Cancer Biology* 3 (2): 89–96.

Folkman, Judah. 2006. “Antiangiogenesis in Cancer Therapy—Endostatin and Its Mechanisms of Action.” *Experimental Cell Research* 312 (5): 594–607. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.015.

Fong, G. H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M. L. Breitman. 1995. “Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium.” *Nature* 376 (6535): 66–70. doi:10.1038/376066a0.

Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, and G. L. Semenza. 1996. “Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 4604–13.

Francia, Giulio, William Cruz-Munoz, Shan Man, Ping Xu, and Robert S. Kerbel. 2011. “Mouse Models of Advanced Spontaneous Metastasis for Experimental Therapeutics.” *Nature Reviews. Cancer* 11 (2): 135–41. doi:10.1038/nrc3001.

Fuchs, Charles S., Jiri Tomasek, Cho Jae Yong, Filip Dumitru, Rodolfo Passalacqua, Chanchal Goswami, Howard Safran, et al. 2014. “Ramucirumab Monotherapy for Previously Treated Advanced Gastric or Gastro-Oesophageal Junction Adenocarcinoma (REGARD): An International, Randomised, Multicentre, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial.” *Lancet (London, England)* 383 (9911): 31–39. doi:10.1016/S0140-6736(13)61719-5.

Garrett, Christopher R., Tanios S. Bekaii-Saab, Theresa Ryan, George A. Fisher, Sally Clive, Petr Kavan, Einat Shacham-Shmueli, Aby Buchbinder, and Richard M. Goldberg. 2013. “Randomized Phase 2 Study of Pegylated SN-38 (EZN-2208) or Irinotecan plus Cetuximab in Patients with Advanced Colorectal Cancer.” *Cancer* 119 (24): 4223–30.

doi:10.1002/cncr.28358.

- Ginestier, Christophe, Hasan Korkaya, Gabriela Dontu, Daniel Birnbaum, Max S. Wicha, and Emmanuelle Charafe-Jauffret. 2007. "[The cancer stem cell: the breast cancer driver]." *Médecine Sciences: M/S* 23 (12): 1133–39. doi:10.1051/medsci/200723121133.
- Goldberg, Richard M., Daniel J. Sargent, Roscoe F. Morton, Charles S. Fuchs, Ramesh K. Ramanathan, Stephen K. Williamson, Brian P. Findlay, Henry C. Pitot, and Steven R. Alberts. 2004. "A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (1): 23–30. doi:10.1200/JCO.2004.09.046.
- Goldmann, E. 1908. "The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with Special Reference to the Vascular System." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1 (Surg Sect): 1–13.
- Gorski, D. H., H. J. Mauceri, R. M. Salloum, S. Gately, S. Hellman, M. A. Beckett, V. P. Sukhatme, G. A. Soff, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. 1998. "Potentiation of the Antitumor Effect of Ionizing Radiation by Brief Concomitant Exposures to Angiostatin." *Cancer Research* 58 (24): 5686–89.
- Goss, K. H., and J. Groden. 2000. "Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (9): 1967–79.
- Gray, Michael J., George Van Buren, Nikolaos A. Dallas, Ling Xia, Xuemei Wang, Anthony D. Yang, Ray J. Somcio, et al. 2008. "Therapeutic Targeting of Neuropilin-2 on Colorectal Carcinoma Cells Implanted in the Murine Liver." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (2): 109–20. doi:10.1093/jnci/djm279.
- Graziano, Francesco, Nadia Galluccio, Paola Lorenzini, Annamaria Ruzzo, Emanuele Canestrari, Silvia D'Emidio, Vincenzo Catalano, et al. 2011. "Genetic Activation of the MET Pathway and Prognosis of Patients with High-Risk, Radically Resected Gastric Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (36): 4789–95. doi:10.1200/JCO.2011.36.7706.
- Grepin, R., M. Guyot, M. Jacquin, J. Durivault, E. Chamorey, A. Sudaka, C. Serdjebi, et al. 2012. "Acceleration of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Growth in Mice Following bevacizumab/Avastin Treatment: The Role of CXCL Cytokines." *Oncogene* 31 (13): 1683–94. doi:10.1038/onc.2011.360.
- Griffioen, Arjan W., Laurie A. Mans, Annemarie M. A. de Graaf, Patrycja Nowak-Sliwinska, Céline L. M. M. de Hoog, Trees A. M. de Jong, Florry A. Vyth-Dreese, Judy R. van Beijnum, Axel Bex, and Eric Jonasch. 2012. "Rapid Angiogenesis Onset after

- Discontinuation of Sunitinib Treatment of Renal Cell Carcinoma Patients.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (14): 3961–71. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0002.
- Griffioen, A. W., and G. Molema. 2000. “Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation.” *Pharmacological Reviews* 52 (2): 237–68.
- Grimwade, David, Anita R. Mistry, Ellen Solomon, and Fabien Guidez. 2010. “Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Differentiation Therapy.” *Cancer Treatment and Research* 145: 219–35. doi:10.1007/978-0-387-69259-3\_13.
- Grotenhuis, B. A., B. P. L. Wijnhoven, and J. J. B. van Lanschot. 2012. “Cancer Stem Cells and Their Potential Implications for the Treatment of Solid Tumors.” *Journal of Surgical Oncology* 106 (2): 209–15. doi:10.1002/jso.23069.
- Grothey, Axel, Eric Van Cutsem, Alberto Sobrero, Salvatore Siena, Alfredo Falcone, Marc Ychou, Yves Humblet, et al. 2013. “Regorafenib Monotherapy for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer (CORRECT): An International, Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial.” *Lancet (London, England)* 381 (9863): 303–12. doi:10.1016/S0140-6736(12)61900-X.
- H**amano, Yuki, Michael Zeisberg, Hikaru Sugimoto, Julie C. Lively, Yohei Maeshima, Changqing Yang, Richard O. Hynes, Zena Werb, Akulapalli Sudhakar, and Raghu Kalluri. 2003. “Physiological Levels of Tumstatin, a Fragment of Collagen IV alpha3 Chain, Are Generated by MMP-9 Proteolysis and Suppress Angiogenesis via alphaV beta3 Integrin.” *Cancer Cell* 3 (6): 589–601.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. “Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis.” *Cell* 86 (3): 353–64.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *Cell* 100 (1): 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144 (5): 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hansel, Donna E., Robert E. Wilentz, Charles J. Yeo, Richard D. Schulick, Elizabeth Montgomery, and Anirban Maitra. 2004. “Expression of Neuropilin-1 in High-Grade Dysplasia, Invasive Cancer, and Metastases of the Human Gastrointestinal Tract.” *The American Journal of Surgical Pathology* 28 (3): 347–56.
- Hashimoto, Kae, Shan Man, Ping Xu, William Cruz-Munoz, Terence Tang, Rakesh Kumar, and Robert S. Kerbel. 2010. “Potent Preclinical Impact of Metronomic Low-Dose Oral Topotecan Combined with the Antiangiogenic Drug Pazopanib for the Treatment of

- Ovarian Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (4): 996–1006. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0960.
- Heddleston, John M., Zhizhong Li, Roger E. McLendon, Anita B. Hjelmeland, and Jeremy N. Rich. 2009. "The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (20): 3274–84.
- Heinrich, Michael C., Robert G. Maki, Christopher L. Corless, Cristina R. Antonescu, Amy Harlow, Diana Griffith, Ajia Town, et al. 2008. "Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate with the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (33): 5352–59. doi:10.1200/JCO.2007.15.7461.
- Hicklin, Daniel J., and Lee M. Ellis. 2005. "Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (5): 1011–27. doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- Hirota, Kiichi, and Gregg L. Semenza. 2006. "Regulation of Angiogenesis by Hypoxia-Inducible Factor 1." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59 (1): 15–26. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.12.003.
- Holmes, Katherine, Owain Ll Roberts, Angharad M. Thomas, and Michael J. Cross. 2007. "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: Structure, Function, Intracellular Signalling and Therapeutic Inhibition." *Cellular Signalling* 19 (10): 2003–12. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
- Horst, David, Lydia Kriegl, Jutta Engel, Thomas Kirchner, and Andreas Jung. 2009. "Prognostic Significance of the Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, and CD166 in Colorectal Cancer." *Cancer Investigation* 27 (8): 844–50. doi:10.1080/07357900902744502.
- Huang, Dan, Yan Ding, Ming Zhou, Brian I. Rini, David Petillo, Chao-Nan Qian, Richard Kahnoski, P. Andrew Futreal, Kyle A. Furge, and Bin Tean Teh. 2010. "Interleukin-8 Mediates Resistance to Antiangiogenic Agent Sunitinib in Renal Cell Carcinoma." *Cancer Research* 70 (3): 1063–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3965.
- Huang, Jianzhong, Jae-O. Bae, Judy P. Tsai, Angela Kadenhe-Chiweshe, Joey Papa, Alice Lee, Shan Zeng, et al. 2009. "Angiopoietin-1/Tie-2 Activation Contributes to Vascular Survival and Tumor Growth during VEGF Blockade." *International Journal of Oncology* 34 (1): 79–87.
- Huang, Suyun, Melissa Van Arsdall, Sean Tedjarati, Marya McCarty, Wenjuan Wu, Robert Langley, and Isaiah J. Fidler. 2002. "Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to

- Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 94 (15): 1134–42.
- Humphries, Adam, and Nicholas A. Wright. 2008. "Colonic Crypt Organization and Tumorigenesis." *Nature Reviews. Cancer* 8 (6): 415–24. doi:10.1038/nrc2392.
- Hurwitz, Herbert, Louis Fehrenbacher, William Novotny, Thomas Cartwright, John Hainsworth, William Heim, Jordan Berlin, et al. 2004. "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 350 (23): 2335–42. doi:10.1056/NEJMoa032691.
- Hutson, Thomas E., Ian D. Davis, Jean-Pascal H. Machiels, Paul L. De Souza, Sylvie Rottey, Bao-Fa Hong, Richard J. Epstein, et al. 2010. "Efficacy and Safety of Pazopanib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (3): 475–80. doi:10.1200/JCO.2008.21.6994.
- Ieta, Keisuke, Fumiaki Tanaka, Naotsugu Haraguchi, Yoshiaki Kita, Hiroyuki Sakashita, Koshi Mimori, Toshifumi Matsumoto, Hiroshi Inoue, Hiroyuki Kuwano, and Masaki Mori. 2008. "Biological and Genetic Characteristics of Tumor-Initiating Cells in Colon Cancer." *Annals of Surgical Oncology* 15 (2): 638–48. doi:10.1245/s10434-007-9605-3.
- Iqbal, Syma, and Heinz-Josef Lenz. 2004. "Integration of Novel Agents in the Treatment of Colorectal Cancer." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 54 Suppl 1 (September): S32–39. doi:10.1007/s00280-004-0884-0.
- Itoh, T., M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto, and S. Itoharu. 1998. "Reduced Angiogenesis and Tumor Progression in Gelatinase A-Deficient Mice." *Cancer Research* 58 (5): 1048–51.
- Jain, Rakesh K. 2003. "Molecular Regulation of Vessel Maturation." *Nature Medicine* 9 (6): 685–93. doi:10.1038/nm0603-685.
- . 2005. "Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5706): 58–62. doi:10.1126/science.1104819.
- Jain, Rakesh K., and Michael F. Booth. 2003. "What Brings Pericytes to Tumor Vessels?" *The Journal of Clinical Investigation* 112 (8): 1134–36. doi:10.1172/JCI20087.
- Jain, Rakesh K., Dan G. Duda, Christopher G. Willett, Dushyant V. Sahani, Andrew X. Zhu, Jay S. Loeffler, Tracy T. Batchelor, and A. Gregory Sorensen. 2009. "Biomarkers of Response and Resistance to Antiangiogenic Therapy." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 6 (6): 327–38. doi:10.1038/nrclinonc.2009.63.
- Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David

- Forman. 2011. "Global Cancer Statistics." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- Jemal, Ahmedin, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Yongping Hao, Jiaquan Xu, and Michael J. Thun. 2009. "Cancer Statistics, 2009." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 59 (4): 225–49. doi:10.3322/caac.20006.
- Jeong, Woondong, Sook Ryun Park, Annamaria Rapisarda, Nicole Fer, Robert J. Kinders, Alice Chen, Giovanni Melillo, et al. 2014. "Weekly EZN-2208 (PEGylated SN-38) in Combination with Bevacizumab in Patients with Refractory Solid Tumors." *Investigational New Drugs* 32 (2): 340–46. doi:10.1007/s10637-013-0048-3.
- Johannsen, Manfred, Anne Flörcken, Axel Bex, Jan Roigas, Marco Cosentino, Vincenzo Ficarra, Christian Kloeters, et al. 2009. "Can Tyrosine Kinase Inhibitors Be Discontinued in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma and a Complete Response to Treatment? A Multicentre, Retrospective Analysis." *European Urology* 55 (6): 1430–38. doi:10.1016/j.eururo.2008.10.021.
- Johnson, Philip J., Shukui Qin, Joong-Won Park, Ronnie T. P. Poon, Jean-Luc Raoul, Philip A. Philip, Chih-Hung Hsu, et al. 2013. "Brivanib versus Sorafenib as First-Line Therapy in Patients with Unresectable, Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results from the Randomized Phase III BRISK-FL Study." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (28): 3517–24. doi:10.1200/JCO.2012.48.4410.
- Jonker, Derek J., Chris J. O'Callaghan, Christos S. Karapetis, John R. Zalcborg, Dongsheng Tu, Heather-Jane Au, Scott R. Berry, et al. 2007. "Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 357 (20): 2040–48. doi:10.1056/NEJMoa071834.
- Julien, Sylvia, Ana Merino-Trigo, Ludovic Lacroix, Marc Pocard, Diane Goéré, Pascale Mariani, Sophie Landron, et al. 2012. "Characterization of a Large Panel of Patient-Derived Tumor Xenografts Representing the Clinical Heterogeneity of Human Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (19): 5314–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0372.
- Kaipainen, A., J. Korhonen, T. Mustonen, V. W. van Hinsbergh, G. H. Fang, D. Dumont, M. Breitman, and K. Alitalo. 1995. "Expression of the Fms-like Tyrosine Kinase 4 Gene Becomes Restricted to Lymphatic Endothelium during Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (8): 3566–70.
- Kalluri, Raghu. 2003. "Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 422–33. doi:10.1038/nrc1094.
- Karkkainen, Marika J., Paula Haiko, Kirsi Sainio, Juha Partanen, Jussi Taipale, Tatiana V.

- Petrova, Michael Jeltsch, et al. 2004. "Vascular Endothelial Growth Factor C Is Required for Sprouting of the First Lymphatic Vessels from Embryonic Veins." *Nature Immunology* 5 (1): 74–80. doi:10.1038/ni1013.
- Kärpänen, Terhi, Caroline A. Heckman, Salla Keskitalo, Michael Jeltsch, Hanna Ollila, Gera Neufeld, Luca Tamagnone, and Kari Alitalo. 2006. "Functional Interaction of VEGF-C and VEGF-D with Neuropilin Receptors." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (9): 1462–72. doi:10.1096/fj.05-5646com.
- Katoh, O., H. Tauchi, K. Kawaishi, A. Kimura, and Y. Satow. 1995. "Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Gene, KDR, in Hematopoietic Cells and Inhibitory Effect of VEGF on Apoptotic Cell Death Caused by Ionizing Radiation." *Cancer Research* 55 (23): 5687–92.
- Kaur, Balveen, Chalet Tan, Daniel J. Brat, Dawn E. Post, and Erwin G. Van Meir. 2004. "Genetic and Hypoxic Regulation of Angiogenesis in Gliomas." *Journal of Neuro-Oncology* 70 (2): 229–43. doi:10.1007/s11060-004-2752-5.
- Kawakami, Tsutomu, Tetsuji Tokunaga, Hiroyuki Hatanaka, Hiroshi Kijima, Hitoshi Yamazaki, Yoshiyuki Abe, Yoshiyuki Osamura, Hiroshi Inoue, Yoshito Ueyama, and Masato Nakamura. 2002. "Neuropilin 1 and Neuropilin 2 Co-Expression Is Significantly Correlated with Increased Vascularity and Poor Prognosis in Nonsmall Cell Lung Carcinoma." *Cancer* 95 (10): 2196–2201. doi:10.1002/cncr.10936.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi, and H. Fujisawa. 1999. "A Requirement for Neuropilin-1 in Embryonic Vessel Formation." *Development (Cambridge, England)* 126 (21): 4895–4902.
- Kerbel, Robert, and Judah Folkman. 2002. "Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors." *Nature Reviews. Cancer* 2 (10): 727–39. doi:10.1038/nrc905.
- Kerbel, Robert S. 2008. "Tumor Angiogenesis." *The New England Journal of Medicine* 358 (19): 2039–49. doi:10.1056/NEJMra0706596.
- Kerbel, R. S. 2000. "Tumor Angiogenesis: Past, Present and the near Future." *Carcinogenesis* 21 (3): 505–15.
- Kim, Yeo-Jung, Hae-June Lee, Tae-Min Kim, T. S. Karin Eisinger-Mathason, Alexia Y. Zhang, Benjamin Schmidt, Daniel L. Karl, et al. 2013. "Overcoming Evasive Resistance from Vascular Endothelial Growth Factor a Inhibition in Sarcomas by Genetic or Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ ." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 132 (1): 29–41. doi:10.1002/ijc.27666.
- Kondo, S., M. Asano, K. Matsuo, I. Ohmori, and H. Suzuki. 1994. "Vascular Endothelial

- Growth Factor/vascular Permeability Factor Is Detectable in the Sera of Tumor-Bearing Mice and Cancer Patients." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1221 (2): 211–14.
- Kreisler, Teri N., Lyndon Kim, Kraig Moore, Paul Duic, Cheryl Royce, Irene Stroud, Nancy Garren, et al. 2009. "Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (5): 740–45. doi:10.1200/JCO.2008.16.3055.
- Krejsa, Cecile, Mark Rogge, and Wolfgang Sadee. 2006. "Protein Therapeutics: New Applications for Pharmacogenetics." *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (6): 507–21. doi:10.1038/nrd2039.
- Labianca, Roberto, Giordano D. Beretta, Basem Kildani, Laura Milesi, Federica Merlin, Stefania Mosconi, M. Adelaide Pessi, et al. 2010. "Colon Cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 74 (2): 106–33. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- Ladomery, Michael R., Steven J. Harper, and David O. Bates. 2007. "Alternative Splicing in Angiogenesis: The Vascular Endothelial Growth Factor Paradigm." *Cancer Letters* 249 (2): 133–42. doi:10.1016/j.canlet.2006.08.015.
- Lantuéjoul, Sylvie, Bruno Constantin, Harry Drabkin, Christian Brambilla, Joëlle Roche, and Elisabeth Brambilla. 2003. "Expression of VEGF, Semaphorin SEMA3F, and Their Common Receptors Neuropilins NP1 and NP2 in Preinvasive Bronchial Lesions, Lung Tumours, and Cell Lines." *The Journal of Pathology* 200 (3): 336–47. doi:10.1002/path.1367.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, and J. E. Dick. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 367 (6464): 645–48. doi:10.1038/367645a0.
- Lassen, Ulrik, Olivier L. Chinot, Catherine McBain, Morten Mau-Sørensen, Vibeke Andrée Larsen, Maryline Barrie, Patrick Roth, et al. 2015. "Phase 1 Dose-Escalation Study of the Antiplacental Growth Factor Monoclonal Antibody RO5323441 Combined with Bevacizumab in Patients with Recurrent Glioblastoma." *Neuro-Oncology* 17 (7): 1007–15. doi:10.1093/neuonc/nov019.
- Latil, A., I. Bièche, S. Pesche, A. Valéri, G. Fournier, O. Cussenot, and R. Lidereau. 2000. "VEGF Overexpression in Clinically Localized Prostate Tumors and Neuropilin-1 Overexpression in Metastatic Forms." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 89 (2): 167–71.
- Lee, Sunyoung, Tom T. Chen, Chad L. Barber, Maria C. Jordan, Jared Murdock, Sharina Desai, Napoleone Ferrara, Andras Nagy, Kenneth P. Roos, and M. Luisa Iruela-Arispe. 2007.

- "Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis." *Cell* 130 (4): 691–703. doi:10.1016/j.cell.2007.06.054.
- Lee, Tae-Hee, Seyha Seng, Masayuki Sekine, Cimona Hinton, Yigong Fu, Hava Karsenty Avraham, and Shalom Avraham. 2007. "Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1." *PLoS Medicine* 4 (6): e186. doi:10.1371/journal.pmed.0040186.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1997. "Genetic Instability in Colorectal Cancers." *Nature* 386 (6625): 623–27. doi:10.1038/386623a0.
- Li, Min, Hui Yang, Hong Chai, William E. Fisher, Xiaoping Wang, F. Charles Brunicaudi, Qizhi Yao, and Changyi Chen. 2004. "Pancreatic Carcinoma Cells Express Neuropilins and Vascular Endothelial Growth Factor, but Not Vascular Endothelial Growth Factor Receptors." *Cancer* 101 (10): 2341–50. doi:10.1002/cncr.20634.
- Lin, Shih-Pei, Yi-Ting Lee, Shung-Haur Yang, Stephanie A. Miller, Shih-Hwa Chiou, Mien-Chie Hung, and Shih-Chieh Hung. 2013. "Colon Cancer Stem Cells Resist Antiangiogenesis Therapy-Induced Apoptosis." *Cancer Letters* 328 (2): 226–34. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.036.
- Li, Shiqing, Karl R. Schmitz, Philip D. Jeffrey, Jed J. W. Wiltzius, Paul Kussie, and Kathryn M. Ferguson. 2005. "Structural Basis for Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor by Cetuximab." *Cancer Cell* 7 (4): 301–11. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.003.
- Liu, Dage, Jun Nakano, Sinya Ishikawa, Hiroyasu Yokomise, Masaki Ueno, Kyuichi Kadota, Masahide Urushihara, and Cheng-Long Huang. 2007. "Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7) Correlates with Tumor Proliferation, and a Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 58 (3): 384–91. doi:10.1016/j.lungcan.2007.07.005.
- Llovet, Josep M., Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, et al. 2008. "Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 359 (4): 378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857.
- Lohela, Marja, Anne Saaristo, Tanja Veikkola, and Kari Alitalo. 2003. "Lymphangiogenic Growth Factors, Receptors and Therapies." *Thrombosis and Haemostasis* 90 (2): 167–84. doi:10.1267/THRO03020167.
- Lord, Reginald V. N., Ji Min Park, Kumari Wickramasinghe, Steven R. DeMeester, Stefan Oberg, Dennis Salonga, Jon Singer, et al. 2003. "Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Expression in Esophageal Adenocarcinoma and Barrett Esophagus." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125 (2): 246–53. doi:10.1067/mtc.2003.203.

- Louie, Elizabeth, Sara Nik, Juei-Suei Chen, Marlies Schmidt, Bo Song, Christine Pacson, Xiu Fang Chen, Seonhye Park, Jingfang Ju, and Emily I. Chen. 2010. "Identification of a Stem-like Cell Population by Exposing Metastatic Breast Cancer Cell Lines to Repetitive Cycles of Hypoxia and Reoxygenation." *Breast Cancer Research: BCR* 12 (6): R94. doi:10.1186/bcr2773.
- Luttun, Aernout, Marc Tjwa, Lieve Moons, Yan Wu, Anne Angelillo-Scherrer, Fang Liao, Janice A. Nagy, et al. 2002. "Revascularization of Ischemic Tissues by PlGF Treatment, and Inhibition of Tumor Angiogenesis, Arthritis and Atherosclerosis by Anti-Flt1." *Nature Medicine* 8 (8): 831–40. doi:10.1038/nm731.
- "Maintenance Strategy with Fluoropyrimidines (FP) plus Bevacizumab (Bev), Bev Alone, or No Treatment, Following a Standard Combination of FP, Oxaliplatin (Ox), and Bev as First-Line Treatment for Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): A Phase III Non-Inferiority Trial (AIO KRK 0207)." 2015. *Journal of Clinical Oncology*. Accessed September 6. <http://meetinglibrary.asco.org/content/133066-144>.
- Mancuso, Michael R., Rachel Davis, Scott M. Norberg, Shaun O'Brien, Barbara Sennino, Tsutomu Nakahara, Virginia J. Yao, et al. 2006. "Rapid Vascular Regrowth in Tumors after Reversal of VEGF Inhibition." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (10): 2610–21. doi:10.1172/JCI24612.
- Markowitz, Sanford D., and Monica M. Bertagnolli. 2009. "Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 361 (25): 2449–60. doi:10.1056/NEJMra0804588.
- Massard, Christophe, Isabelle Borget, Marie Cécile Le Deley, Melissa Taylor, Carlos Gomez-Roca, Jean Charles Soria, and Françoise Farace. 2012. "Prognostic Value of Circulating VEGFR2+ Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Patients with Advanced Cancer." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48 (9): 1354–62. doi:10.1016/j.ejca.2012.01.021.
- Masson, Véronique, Laura Rodriguez de la Ballina, Carine Munaut, Ben Wielockx, Maud Jost, Catherine Maillard, Silvia Blacher, et al. 2005. "Contribution of Host MMP-2 and MMP-9 to Promote Tumor Vascularization and Invasion of Malignant Keratinocytes." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2): 234–36. doi:10.1096/fj.04-2140fje.
- Mauceri, H. J., N. N. Hanna, M. A. Beckett, D. H. Gorski, M. J. Staba, K. A. Stellato, K. Bigelow, et al. 1998. "Combined Effects of Angiostatin and Ionizing Radiation in Antitumour Therapy." *Nature* 394 (6690): 287–91. doi:10.1038/28412.
- McDonald, Donald M., and Peter Baluk. 2002. "Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer." *Cancer Research* 62 (18): 5381–85.

- McDonald, Donald M., and Peter L. Choyke. 2003. "Imaging of Angiogenesis: From Microscope to Clinic." *Nature Medicine* 9 (6): 713–25. doi:10.1038/nm0603-713.
- Migliore, Lucia, Francesca Migheli, Roberto Spisni, and Fabio Coppedè. 2011. "Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011: 792362. doi:10.1155/2011/792362.
- Miller, Kathy D., Christopher J. Sweeney, and George W. Sledge. 2005. "Can Tumor Angiogenesis Be Inhibited without Resistance?" *EXS*, no. 94: 95–112.
- Miller, Kathy, Molin Wang, Julie Gralow, Maura Dickler, Melody Cobleigh, Edith A. Perez, Tamara Shenkier, David Cella, and Nancy E. Davidson. 2007. "Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 357 (26): 2666–76. doi:10.1056/NEJMoa072113.
- Minde, David P., Zeinab Anvarian, Stefan Gd Rüdiger, and Madelon M. Maurice. 2011. "Messing up Disorder: How Do Missense Mutations in the Tumor Suppressor Protein APC Lead to Cancer?" *Molecular Cancer* 10: 101. doi:10.1186/1476-4598-10-101.
- Miquerol, L., B. L. Langille, and A. Nagy. 2000. "Embryonic Development Is Disrupted by Modest Increases in Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression." *Development (Cambridge, England)* 127 (18): 3941–46.
- Monti, Elena, and Marzia B. Gariboldi. 2011. "HIF-1 as a Target for Cancer Chemotherapy, Chemosensitization and Chemoprevention." *Current Molecular Pharmacology* 4 (1): 62–77.
- Motzer, Robert J., Bernard Escudier, Piotr Tomczak, Thomas E. Hutson, M. Dror Michaelson, Sylvie Negrier, Stephane Oudard, et al. 2013. "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* 14 (6): 552–62. doi:10.1016/S1470-2045(13)70093-7.
- Motzer, Robert J., Dmitry Nosov, Timothy Eisen, Igor Bondarenko, Vladimir Lesovoy, Oleg Lipatov, Piotr Tomczak, et al. 2013. "Tivozanib versus Sorafenib as Initial Targeted Therapy for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results from a Phase III Trial." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (30): 3791–99. doi:10.1200/JCO.2012.47.4940.
- Motzer, Robert J., Camillo Porta, Nicholas J. Vogelzang, Cora N. Sternberg, Cezary Szczylik, Jakub Zolnierek, Christian Kollmannsberger, et al. 2014. "Dovitinib versus Sorafenib for Third-Line Targeted Treatment of Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 15 (3): 286–96. doi:10.1016/S1470-2045(14)70030-0.

- Mourad, J.-J., G. des Guetz, H. Debbabi, and B. I. Levy. 2008. "Blood Pressure Rise Following Angiogenesis Inhibition by Bevacizumab. A Crucial Role for Microcirculation." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19 (5): 927–34. doi:10.1093/annonc/mdm550.
- N**atori, Takeshi, Masataka Sata, Miwa Washida, Yasunobu Hirata, Ryozo Nagai, and Masatoshi Makuuchi. 2002. "G-CSF Stimulates Angiogenesis and Promotes Tumor Growth: Potential Contribution of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297 (4): 1058–61.
- Norden, A. D., G. S. Young, K. Setayesh, A. Muzikansky, R. Klufas, G. L. Ross, A. S. Ciampa, et al. 2008. "Bevacizumab for Recurrent Malignant Gliomas: Efficacy, Toxicity, and Patterns of Recurrence." *Neurology* 70 (10): 779–87. doi:10.1212/01.wnl.0000304121.57857.38.
- Nyberg, Pia, Liang Xie, and Raghu Kalluri. 2005. "Endogenous Inhibitors of Angiogenesis." *Cancer Research* 65 (10): 3967–79. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.
- O**kines, Alicia, David Cunningham, and Ian Chau. 2011. "Targeting the Human EGFR Family in Esophagogastric Cancer." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8 (8): 492–503. doi:10.1038/nrclinonc.2011.45.
- Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo. 1999. "Current Biology of VEGF-B and VEGF-C." *Current Opinion in Biotechnology* 10 (6): 528–35.
- Olsson, Anna-Karin, Anna Dimberg, Johan Kreuger, and Lena Claesson-Welsh. 2006. "VEGF Receptor Signalling - in Control of Vascular Function." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (5): 359–71. doi:10.1038/nrm1911.
- O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. 1997. "Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth." *Cell* 88 (2): 277–85.
- P**àez-Ribes, Marta, Elizabeth Allen, James Hudock, Takaaki Takeda, Hiroaki Okuyama, Francesc Viñals, Masahiro Inoue, Gabriele Bergers, Douglas Hanahan, and Oriol Casanovas. 2009. "Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis." *Cancer Cell* 15 (3): 220–31. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.027.
- Parikh, Alexander A., Fan Fan, Wen Biao Liu, Syed A. Ahmad, Oliver Stoeltzing, Niels Reinmuth, Diane Bielenberg, Corazon D. Bucana, Michael Klagsbrun, and Lee M. Ellis. 2004. "Neuropilin-1 in Human Colon Cancer: Expression, Regulation, and Role in Induction of Angiogenesis." *The American Journal of Pathology* 164 (6): 2139–51. doi:10.1016/S0002-9440(10)63772-8.

- Park, J. E., H. H. Chen, J. Winer, K. A. Houck, and N. Ferrara. 1994. "Placenta Growth Factor. Potentiation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioactivity, in Vitro and in Vivo, and High Affinity Binding to Flt-1 but Not to Flk-1/KDR." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (41): 25646–54.
- Patan, S., L. L. Munn, and R. K. Jain. 1996. "Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis." *Microvascular Research* 51 (2): 260–72. doi:10.1006/mvre.1996.0025.
- Pathak, Arvind P., Warren E. Hochfeld, Simon L. Goodman, and Michael S. Pepper. 2008. "Circulating and Imaging Markers for Angiogenesis." *Angiogenesis* 11 (4): 321–35. doi:10.1007/s10456-008-9119-z.
- Pengjun, Zhang, Wen Xinyu, Gu Feng, Deng Xinxin, Liu Yulan, Li Juan, Jia Xingwang, Dong Zhennan, and Tian Yaping. 2013. "Multiplexed Cytokine Profiling of Serum for Detection of Colorectal Cancer." *Future Oncology (London, England)* 9 (7): 1017–27. doi:10.2217/fon.13.71.
- Pennacchietti, Selma, Paolo Michieli, Maria Galluzzo, Massimiliano Mazzone, Silvia Giordano, and Paolo M. Comoglio. 2003. "Hypoxia Promotes Invasive Growth by Transcriptional Activation of the Met Protooncogene." *Cancer Cell* 3 (4): 347–61.
- Perren, Timothy J., Ann Marie Swart, Jacobus Pfisterer, Jonathan A. Ledermann, Eric Pujade-Lauraine, Gunnar Kristensen, Mark S. Carey, et al. 2011. "A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer." *The New England Journal of Medicine* 365 (26): 2484–96. doi:10.1056/NEJMoa1103799.
- Peruzzi, Benedetta, and Donald P. Bottaro. 2006. "Targeting the c-Met Signaling Pathway in Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (12): 3657–60. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0818.
- Peters, K. G., C. De Vries, and L. T. Williams. 1993. "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression during Embryogenesis and Tissue Repair Suggests a Role in Endothelial Differentiation and Blood Vessel Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (19): 8915–19.
- Pino, Maria S., and Daniel C. Chung. 2010. "The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer." *Gastroenterology* 138 (6): 2059–72. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- Poon, Evon, Adrian L. Harris, and Margaret Ashcroft. 2009. "Targeting the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Pathway in Cancer." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11: e26. doi:10.1017/S1462399409001173.
- Radtke, Freddy, and Hans Clevers. 2005. "Self-Renewal and Cancer of the Gut: Two Sides of a Coin." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5717): 1904–9. doi:10.1126/science.1104815.

- Rafii, Shahin, David Lyden, Robert Benezra, Koichi Hattori, and Beate Heissig. 2002. "Vascular and Haematopoietic Stem Cells: Novel Targets for Anti-Angiogenesis Therapy?" *Nature Reviews. Cancer* 2 (11): 826–35. doi:10.1038/nrc925.
- Ramlau, Rodryg, Vera Gorbunova, Tudor Eliade Ciuleanu, Silvia Novello, Mustafa Ozguroglu, Tuncay Goksel, Clarissa Baldotto, et al. 2012. "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* 30 (29): 3640–47. doi:10.1200/JCO.2012.42.6932.
- Rapisarda, Annamaria, Melinda Hollingshead, Badarch Uranchimeg, Carrie A. Bonomi, Suzanne D. Borgel, John P. Carter, Bradley Gehrs, et al. 2009. "Increased Antitumor Activity of Bevacizumab in Combination with Hypoxia Inducible Factor-1 Inhibition." *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (7): 1867–77. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0274.
- Rapisarda, Annamaria, and Giovanni Melillo. 2009. "Role of the Hypoxic Tumor Microenvironment in the Resistance to Anti-Angiogenic Therapies." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 12 (3): 74–80. doi:10.1016/j.drug.2009.03.002.
- Rapisarda, Annamaria, Jessica Zalek, Melinda Hollingshead, Till Braunschweig, Badarch Uranchimeg, Carrie A. Bonomi, Suzanne D. Borgel, et al. 2004. "Schedule-Dependent Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Protein Accumulation, Angiogenesis, and Tumor Growth by Topotecan in U251-HRE Glioblastoma Xenografts." *Cancer Research* 64 (19): 6845–48. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2116.
- Raymond, Eric, Laetitia Dahan, Jean-Luc Raoul, Yung-Jue Bang, Ivan Borbath, Catherine Lombard-Bohas, Juan Valle, et al. 2011. "Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors." *The New England Journal of Medicine* 364 (6): 501–13. doi:10.1056/NEJMoa1003825.
- Relf, M., S. LeJeune, P. A. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, A. Moghaddam, R. Whitehouse, R. Bicknell, and A. L. Harris. 1997. "Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor Beta-1, Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary Breast Cancer and Its Relation to Angiogenesis." *Cancer Research* 57 (5): 963–69.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. 2001. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature* 414 (6859): 105–11. doi:10.1038/35102167.
- Reynolds, L. P., and D. A. Redmer. 2001. "Angiogenesis in the Placenta." *Biology of Reproduction* 64 (4): 1033–40.

- Ribatti, Domenico. 2009a. "The Discovery of Antiangiogenic Molecules: A Historical Review." *Current Pharmaceutical Design* 15 (4): 345–52.
- . 2009b. "Endogenous Inhibitors of Angiogenesis: A Historical Review." *Leukemia Research* 33 (5): 638–44. doi:10.1016/j.leukres.2008.11.019.
- Richard, Stéphane, Joyce Graff, Jan Lindau, and François Resche. 2004. "Von Hippel-Lindau Disease." *Lancet (London, England)* 363 (9416): 1231–34. doi:10.1016/S0140-6736(04)15957-6.
- Rini, Brian I., Bernard Escudier, Piotr Tomczak, Andrey Kaprin, Cezary Szczylik, Thomas E. Hutson, M. Dror Michaelson, et al. 2011. "Comparative Effectiveness of Axitinib versus Sorafenib in Advanced Renal Cell Carcinoma (AXIS): A Randomised Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 378 (9807): 1931–39. doi:10.1016/S0140-6736(11)61613-9.
- Rini, Brian I., George Wilding, Gary Hudes, Walter M. Stadler, Sinil Kim, Jamal Tarazi, Brad Rosbrook, Peter C. Trask, Laura Wood, and Janice P. Dutcher. 2009. "Phase II Study of Axitinib in Sorafenib-Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (27): 4462–68. doi:10.1200/JCO.2008.21.7034.
- Rocha-Lima, Caio M., Heloisa P. Soares, Luis E. Raez, and Rakesh Singal. 2007. "EGFR Targeting of Solid Tumors." *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 14 (3): 295–304.
- Rolny, Charlotte, Massimiliano Mazzone, Sònia Tugues, Damya Laoui, Irja Johansson, Cathy Coulon, Mario Leonardo Squadrito, et al. 2011. "HRG Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Inducing Macrophage Polarization and Vessel Normalization through Downregulation of PlGF." *Cancer Cell* 19 (1): 31–44. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.009.
- Roskoski, Robert. 2007. "Sunitinib: A VEGF and PDGF Receptor Protein Kinase and Angiogenesis Inhibitor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 (2): 323–28. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.156.
- Salgia, Ravi. 2011. "Prognostic Significance of Angiogenesis and Angiogenic Growth Factors in Nonsmall Cell Lung Cancer." *Cancer* 117 (17): 3889–99. doi:10.1002/cncr.25935.
- Sallinen, Hanna, Maarit Anttila, Johanna Narvainen, Jonna Koponen, Kirsi Hamalainen, Ivana Kholova, Tommi Heikura, et al. 2009. "Antiangiogenic Gene Therapy with Soluble VEGFR-1, -2, and -3 Reduces the Growth of Solid Human Ovarian Carcinoma in Mice." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (2): 278–84. doi:10.1038/mt.2008.258.
- Sanchez-Carbayo, Marta, Nicholas D. Socci, Juan Jose Lozano, Wentian Li, Elizabeth

- Charytonowicz, Thomas J. Belbin, Michael B. Prystowsky, Angel R. Ortiz, Geoffrey Childs, and Carlos Cordon-Cardo. 2003. "Gene Discovery in Bladder Cancer Progression Using cDNA Microarrays." *The American Journal of Pathology* 163 (2): 505–16. doi:10.1016/S0002-9440(10)63679-6.
- Sancho, Elena, Eduard Batlle, and Hans Clevers. 2004. "Signaling Pathways in Intestinal Development and Cancer." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 695–723. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.092805.
- Sandler, Alan, Robert Gray, Michael C. Perry, Julie Brahmer, Joan H. Schiller, Afshin Dowlati, Rogerio Lilenbaum, and David H. Johnson. 2006. "Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine* 355 (24): 2542–50. doi:10.1056/NEJMoa061884.
- Sathornsumetee, Sith, Yiting Cao, Jennifer E. Marcello, James E. Herndon, Roger E. McLendon, Annick Desjardins, Henry S. Friedman, Mark W. Dewhirst, James J. Vredenburgh, and Jeremy N. Rich. 2008. "Tumor Angiogenic and Hypoxic Profiles Predict Radiographic Response and Survival in Malignant Astrocytoma Patients Treated with Bevacizumab and Irinotecan." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (2): 271–78. doi:10.1200/JCO.2007.13.3652.
- Sato, Y., R. Tsuboi, R. Lyons, H. Moses, and D. B. Rifkin. 1990. "Characterization of the Activation of Latent TGF-Beta by Co-Cultures of Endothelial Cells and Pericytes or Smooth Muscle Cells: A Self-Regulating System." *The Journal of Cell Biology* 111 (2): 757–63.
- Schatton, Tobias, Natasha Y. Frank, and Markus H. Frank. 2009. "Identification and Targeting of Cancer Stem Cells." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 31 (10): 1038–49. doi:10.1002/bies.200900058.
- Schoenhals, Matthieu, Alboukadel Kassambara, John De Vos, Dirk Hose, Jérôme Moreaux, and Bernard Klein. 2009. "Embryonic Stem Cell Markers Expression in Cancers." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2): 157–62. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.156.
- Scoville, David H., Toshiro Sato, Xi C. He, and Linheng Li. 2008. "Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling." *Gastroenterology* 134 (3): 849–64. doi:10.1053/j.gastro.2008.01.079.
- Seandel, Marco, Jason Butler, David Lyden, and Shahin Rafii. 2008. "A Catalytic Role for Proangiogenic Marrow-Derived Cells in Tumor Neovascularization." *Cancer Cell* 13 (3): 181–83. doi:10.1016/j.ccr.2008.02.016.
- "SEER Cancer Statistics Review 1975-2006 - Previous Version - SEER Cancer Statistics." 2015.

Accessed September 5. [http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2006/](http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2006/).

- Semenza, G. L. 2010. "Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics." *Oncogene* 29 (5): 625–34. doi:10.1038/onc.2009.441.
- Semenza, Gregg L. 2003. "Targeting HIF-1 for Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 3 (10): 721–32. doi:10.1038/nrc1187.
- Sennino, Barbara, and Donald M. McDonald. 2012. "Controlling Escape from Angiogenesis Inhibitors." *Nature Reviews. Cancer* 12 (10): 699–709. doi:10.1038/nrc3366.
- Seppinen, Lotta, Raija Sormunen, Ylermi Soini, Harri Elamaa, Ritva Heljasvaara, and Taina Pihlajaniemi. 2008. "Lack of Collagen XVIII Accelerates Cutaneous Wound Healing, While Overexpression of Its Endostatin Domain Leads to Delayed Healing." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 27 (6): 535–46. doi:10.1016/j.matbio.2008.03.003.
- Shaked, Yuval, Alessia Ciarrocchi, Marcela Franco, Christina R. Lee, Shan Man, Alison M. Cheung, Daniel J. Hicklin, et al. 2006. "Therapy-Induced Acute Recruitment of Circulating Endothelial Progenitor Cells to Tumors." *Science (New York, N.Y.)* 313 (5794): 1785–87. doi:10.1126/science.1127592.
- Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, and A. C. Schuh. 1995. "Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice." *Nature* 376 (6535): 62–66. doi:10.1038/376062a0.
- Shibuya, Masabumi, and Lena Claesson-Welsh. 2006. "Signal Transduction by VEGF Receptors in Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis." *Experimental Cell Research* 312 (5): 549–60. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
- Shojaei, Farbod, Joseph H. Lee, Brett H. Simmons, Anthony Wong, Carlos O. Esparza, Pamela A. Plumlee, Junli Feng, Albert E. Stewart, Dana D. Hu-Lowe, and James G. Christensen. 2010. "HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors." *Cancer Research* 70 (24): 10090–100. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0489.
- Shojaei, Farbod, Xiumin Wu, Ajay K. Malik, Cuiling Zhong, Megan E. Baldwin, Stefanie Schanz, Germaine Fuh, Hans-Peter Gerber, and Napoleone Ferrara. 2007. "Tumor Refractoriness to Anti-VEGF Treatment Is Mediated by CD11b+Gr1+ Myeloid Cells." *Nature Biotechnology* 25 (8): 911–20. doi:10.1038/nbt1323.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet. 1992. "Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-Initiated Angiogenesis." *Nature* 359 (6398): 843–45. doi:10.1038/359843a0.
- Simkens, Lieke H. J., Harm van Tinteren, Anne May, Albert J. ten Tije, Geert-Jan M. Creemers, Olaf J. L. Loosveld, Felix E. de Jongh, et al. 2015. "Maintenance Treatment with

- Capecitabine and Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer (CAIRO3): A Phase 3 Randomised Controlled Trial of the Dutch Colorectal Cancer Group." *Lancet (London, England)* 385 (9980): 1843–52. doi:10.1016/S0140-6736(14)62004-3.
- Sleijfer, Stefan, Isabelle Ray-Coquard, Zsuzsa Papai, Axel Le Cesne, Michelle Scurr, Patrick Schöffski, Françoise Collin, et al. 2009. "Pazopanib, a Multikinase Angiogenesis Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Phase II Study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC Study 62043)." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (19): 3126–32. doi:10.1200/JCO.2008.21.3223.
- Sobrero, Alberto F., Joan Maurel, Louis Fehrenbacher, Werner Scheithauer, Yousif A. Abubakr, Manfred P. Lutz, M. Eugenia Vega-Villegas, et al. 2008. "EPIC: Phase III Trial of Cetuximab plus Irinotecan after Fluoropyrimidine and Oxaliplatin Failure in Patients with Metastatic Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (14): 2311–19. doi:10.1200/JCO.2007.13.1193.
- Soker, S., S. Gollamudi-Payne, H. Fidder, H. Charmahelli, and M. Klagsbrun. 1997. "Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Endothelial Cell Proliferation by a Peptide Corresponding to the Exon 7-Encoded Domain of VEGF165." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31582–88.
- Spano, J.-P., C. Lagorce, D. Atlan, G. Milano, J. Domont, R. Benamouzig, A. Attar, et al. 2005. "Impact of EGFR Expression on Colorectal Cancer Patient Prognosis and Survival." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16 (1): 102–8. doi:10.1093/annonc/mdi006.
- Stacker, S. A., C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, D. G. Jackson, S. Nishikawa, H. Kubo, and M. G. Achen. 2001. "VEGF-D Promotes the Metastatic Spread of Tumor Cells via the Lymphatics." *Nature Medicine* 7 (2): 186–91. doi:10.1038/84635.
- Stephenson, John M., Snigdha Banerjee, Neela K. Saxena, Rachel Cherian, and Sushanta K. Banerjee. 2002. "Neuropilin-1 Is Differentially Expressed in Myoepithelial Cells and Vascular Smooth Muscle Cells in Preneoplastic and Neoplastic Human Breast: A Possible Marker for the Progression of Breast Cancer." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 101 (5): 409–14. doi:10.1002/ijc.10611.
- Sternberg, Cora N., Ian D. Davis, Jozef Mardiak, Cezary Szczylik, Eunsik Lee, John Wagstaff, Carlos H. Barrios, et al. 2010. "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* 28 (6): 1061–68.

doi:10.1200/JCO.2009.23.9764.

- Stoeltzing, Oliver, Wenbiao Liu, Niels Reinmuth, Alexander Parikh, Syed A. Ahmad, Young D. Jung, Fan Fan, and Lee M. Ellis. 2003. "Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy of Colon Cancer Liver Metastasis." *Annals of Surgical Oncology* 10 (7): 722–33.
- Streit, M., P. Velasco, L. Riccardi, L. Spencer, L. F. Brown, L. Janes, B. Lange-Asschenfeldt, et al. 2000. "Thrombospondin-1 Suppresses Wound Healing and Granulation Tissue Formation in the Skin of Transgenic Mice." *The EMBO Journal* 19 (13): 3272–82. doi:10.1093/emboj/19.13.3272.
- Strieter, Robert M., Marie D. Burdick, Brigitte N. Gomperts, John A. Belperio, and Michael P. Keane. 2005. "CXC Chemokines in Angiogenesis." *Cytokine & Growth Factor Reviews, Chemokines*, 16 (6): 593–609. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.04.007.
- Swift, Matthew R., and Brant M. Weinstein. 2009. "Arterial-Venous Specification during Development." *Circulation Research* 104 (5): 576–88. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188805.
- Takahashi, Y., Y. Kitadai, C. D. Bucana, K. R. Cleary, and L. M. Ellis. 1995. "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, KDR, Correlates with Vascularity, Metastasis, and Proliferation of Human Colon Cancer." *Cancer Research* 55 (18): 3964–68.
- Takebe, Naoko, Pamela J. Harris, Ronald Q. Warren, and S. Percy Ivy. 2011. "Targeting Cancer Stem Cells by Inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog Pathways." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8 (2): 97–106. doi:10.1038/nrclinonc.2010.196.
- Tammela, Tuomas, Georgia Zarkada, Elisabet Wallgard, Aino Murtomäki, Steven Suchting, Maria Wirzenius, Marika Waltari, et al. 2008. "Blocking VEGFR-3 Suppresses Angiogenic Sprouting and Vascular Network Formation." *Nature* 454 (7204): 656–60. doi:10.1038/nature07083.
- Todaro, Matilde, Maria Giovanna Francipane, Jan Paul Medema, and Giorgio Stassi. 2010. "Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy." *Gastroenterology* 138 (6): 2151–62. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.063.
- Tomida, Chisato, Naoko Yamagishi, Kana Aibara, Chiaki Yano, Takayuki Uchida, Tomoki Abe, Ayako Ohno, Katsuya Hirasaka, Takeshi Nikawa, and Shigetada Teshima-Kondo. 2015. "Chronic Exposure of VEGF Inhibitors Promotes the Malignant Phenotype of Colorectal Cancer Cells." *The Journal of Medical Investigation: JMI* 62 (1-2): 75–79. doi:10.2152/jmi.62.75.
- Tournigand, Christophe, Thierry André, Emmanuel Achille, Gérard Lledo, Michel Flesh, Dominique Mery-Mignard, Emmanuel Quinaux, et al. 2004. "FOLFIRI Followed by

- FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (2): 229–37. doi:10.1200/JCO.2004.05.113.
- Trastour, Cynthia, Emmanuel Benizri, Francette Ettore, Alain Ramaioli, Emmanuel Chamorey, Jacques Pouysségur, and Edurne Berra. 2007. "HIF-1alpha and CA IX Staining in Invasive Breast Carcinomas: Prognosis and Treatment Outcome." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 120 (7): 1451–58. doi:10.1002/ijc.22436.
- Vagnucci, Anthony H., and William W. Li. 2003. "Alzheimer's Disease and Angiogenesis." *Lancet (London, England)* 361 (9357): 605–8. doi:10.1016/S0140-6736(03)12521-4.
- Van Cutsem, Eric, Josep Tabernero, Radek Lakomy, Hans Prenen, Jana Prausová, Teresa Macarulla, Paul Ruff, et al. 2012. "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* 30 (28): 3499–3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201.
- Van de Veire, Sara, Ingeborg Stalmans, Femke Heindryckx, Hajimu Oura, Annemiläi Tijeras-Raballand, Thomas Schmidt, Sonja Loges, et al. 2010. "Further Pharmacological and Genetic Evidence for the Efficacy of PlGF Inhibition in Cancer and Eye Disease." *Cell* 141 (1): 178–90. doi:10.1016/j.cell.2010.02.039.
- Vasudev, Naveen S., and Andrew R. Reynolds. 2014. "Anti-Angiogenic Therapy for Cancer: Current Progress, Unresolved Questions and Future Directions." *Angiogenesis* 17 (3): 471–94. doi:10.1007/s10456-014-9420-y.
- Velho, Sergia, and Kevin M. Haigis. 2011. "Regulation of Homeostasis and Oncogenesis in the Intestinal Epithelium by Ras." *Experimental Cell Research* 317 (19): 2732–39. doi:10.1016/j.yexcr.2011.06.002.
- Vermeulen, Louis, Felipe de Sousa e Melo, Dick J. Richel, and Jan Paul Medema. 2012. "The Developing Cancer Stem-Cell Model: Clinical Challenges and Opportunities." *The Lancet. Oncology* 13 (2): e83–89. doi:10.1016/S1470-2045(11)70257-1.
- Viola, David, Virginia Cappagli, and Rossella Elisei. 2013. "Cabozantinib (XL184) for the Treatment of Locally Advanced or Metastatic Progressive Medullary Thyroid Cancer." *Future Oncology (London, England)* 9 (8): 1083–92. doi:10.2217/fon.13.128.
- Vu, T. H., J. M. Shipley, G. Bergers, J. E. Berger, J. A. Helms, D. Hanahan, S. D. Shapiro, R. M. Senior, and Z. Werb. 1998. "MMP-9/gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes." *Cell* 93 (3): 411–22.

- W**elti, J. C., M. Gourlaouen, T. Powles, S. C. Kudahetti, P. Wilson, D. M. Berney, and A. R. Reynolds. 2011. "Fibroblast Growth Factor 2 Regulates Endothelial Cell Sensitivity to Sunitinib." *Oncogene* 30 (10): 1183–93. doi:10.1038/onc.2010.503.
- Welti, Jonathan C., Thomas Powles, Shane Foo, Morgane Gourlaouen, Natasha Preece, Julie Foster, Sophia Frentzas, et al. 2012. "Contrasting Effects of Sunitinib within in Vivo Models of Metastasis." *Angiogenesis* 15 (4): 623–41. doi:10.1007/s10456-012-9291-z.
- Wilke, Hansjochen, Kei Muro, Eric Van Cutsem, Sang-Cheul Oh, György Bodoky, Yasuhiro Shimada, Shuichi Hironaka, et al. 2014. "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* 15 (11): 1224–35. doi:10.1016/S1470-2045(14)70420-6.
- Willett, Christopher G., Yves Boucher, Dan G. Duda, Emmanuelle di Tomaso, Lance L. Munn, Ricky T. Tong, Sergey V. Kozin, et al. 2005. "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: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (31): 8136–39. doi:10.1200/JCO.2005.02.5635.
- Winder, Thomas, and Heinz-Josef Lenz. 2010. "Molecular Predictive and Prognostic Markers in Colon Cancer." *Cancer Treatment Reviews* 36 (7): 550–56. doi:10.1016/j.ctrv.2010.03.005.
- Worthley, Daniel-L., Vicki-L. Whitehall, Kevin-J. Spring, and Barbara-A. Leggett. 2007. "Colorectal Carcinogenesis: Road Maps to Cancer." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 13 (28): 3784–91.
- X**ing, Xiao-Jing, Xiao-Hu Gu, and Tian-Fei Ma. 2014. "Relationship of Serum MMP-7 Levels for Colorectal Cancer: A Meta-Analysis." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (10): 10515–22. doi:10.1007/s13277-014-2349-3.
- Y**amagishi, Naoko, Shigetada Teshima-Kondo, Kiyoshi Masuda, Kensei Nishida, Yuki Kuwano, Duyen T. Dang, Long H. Dang, Takeshi Nikawa, and Kazuhito Rokutan. 2013. "Chronic Inhibition of Tumor Cell-Derived VEGF Enhances the Malignant Phenotype of Colorectal Cancer Cells." *BMC Cancer* 13: 229. doi:10.1186/1471-2407-13-229.
- You, Weon-Kyoo, Barbara Sennino, Casey W. Williamson, Beverly Falcón, Hiroya Hashizume, Li-Chin Yao, Dana T. Aftab, and Donald M. McDonald. 2011. "VEGF and c-Met Blockade Amplify Angiogenesis Inhibition in Pancreatic Islet Cancer." *Cancer Research* 71 (14): 4758–68. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2527.

- Yuan, Li, Delphine Moyon, Luc Pardanaud, Christiane Bréant, Marika J. Karkkainen, Kari Alitalo, and Anne Eichmann. 2002. "Abnormal Lymphatic Vessel Development in Neuropilin 2 Mutant Mice." *Development (Cambridge, England)* 129 (20): 4797–4806.
- Yu, J. L., J. W. Rak, P. Carmeliet, A. Nagy, R. S. Kerbel, and B. L. Coomber. 2001. "Heterogeneous Vascular Dependence of Tumor Cell Populations." *The American Journal of Pathology* 158 (4): 1325–34. doi:10.1016/S0002-9440(10)64083-7.
- Yu, Yang, Grace Ramena, and Randolph C. Elble. 2012. "The Role of Cancer Stem Cells in Relapse of Solid Tumors." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4: 1528–41.
- Zeng, Fanwei, Fanghong Luo, Sha Lv, Haipeng Zhang, Chang Cao, Xiaoli Chen, Shengyu Wang, et al.** 2014. "A Monoclonal Antibody Targeting Neuropilin-1 Inhibits Adhesion of MCF7 Breast Cancer Cells to Fibronectin by Suppressing the FAK/p130cas Signaling Pathway." *Anti-Cancer Drugs* 25 (6): 663–72. doi:10.1097/CAD.0000000000000091.



# **PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES**



## Communications orales

Ces travaux de recherche m'ont permis de présenter mes résultats à plusieurs reprises :

4 Avril 2014 : *5th Congress of the French Society of Angiogenesis*. Evaluation of discontinuing VEGF control as a pro-metastatic process in human colon cancer model. Chamonix, France.

24 Avril 2014 : *13<sup>ème</sup> Rencontre Jeunes Scientifiques organisées par l'ADELIH*. Evaluation de l'arrêt du contrôle du VEGF en tant que processus pro-métastatique dans un modèle de cancer du côlon humain. Paris, France.

25 Avril 2014 : Communication orale au réunion du groupe côlon à l'institut curie. Modélisation de l'effet d'un anti-VEGF, en adjuvant d'un cancer colique ou en interruption thérapeutique en stade avancé. Paris, France.

## Poster

Ces travaux de recherche ont donné lieux à deux présentations sous forme de poster :

Selma Becherirat, Olivier Zajac, Fatemeh Valamanesh, *et al.* Development of a human xenograft model to study the efficacy of the combination of bevacizumab and FOLFOX as adjuvant therapy in colon cancer. *9 th International Symposium on Minimal Residual Cancer*. September 25-27, 2013.

Selma Becherirat, Fatemeh Valamanesh, Jean-Marie Launay, *et al.* Postoperative antiangiogenic as adjuvant treatment induce a metastatic process in a human orthotopic colon cancer model. *5th Congress of the French Society of Angiogenesis*. Avril 2-4, 2014.

## Encadrement

Durant cette thèse j'ai pu encadrer un étudiant en IUT Génie Biologique, Thomas COMANDON, pendant 2 mois.

## Diplôme Universitaire "Expérimentation Animale"

En 2013, j'ai validé le diplôme universitaire "Expérimentation Animale" (Niveau I) me donnant le droit de manipuler les animaux vivants sous ma propre responsabilité.











# **ANNEXE**

Durant ma thèse j'ai pu également publier les résultats de mon projet de Master 2, que j'ai réalisé au laboratoire de « *Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament* » (EA 3452) à la Faculté de Pharmacie de Nancy.