

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par Karen COLMOU

IMPACT DU FRACTIONNEMENT DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL

Thèse présentée et soutenue à la faculté de médecine de Nantes, le 16 novembre 2018
Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers,
INSERM U1232, Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Dr Marie DUTREIX, DR, Institut Curie

Pr Florence HUGUET, PU-PH, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris

Composition du Jury :

Président : Pr Jaafar BENNOUNA, PU-PH, Faculté de médecine de Nantes

Examinatrice: Dr Agnès FRANCOIS, CR, HDR, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Directeur. de thèse : Dr Stéphane SUPIOT, MCU-MCLCC, Faculté de médecine de Nantes

Co-directeur de thèse : Dr François PARIS, DR, CRCINA INSERM U1232

*Document provisoire destiné au rapport préalable à la
soutenance*

Remerciements

Articles, présentations orales et affichées de ces travaux

- **Article publié :**

- Guipaud O, Jaillet C, Clement-Colmou K, François A, Supiot S, Milliat F, *Importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy*. British Journal of Radiology, 2018 Ap 9

- **Articles soumis, en cours de revue :**

- Karen Clément-Colmou, Vincent Potiron, Manon Pietri, Maëva Guillonnet, Emmanuel Jouglar, Sophie Chiavassa, Grégory Delpon, François Paris, Stéphane Supiot. *Influence of radiotherapy fractionation schedule on tumor vascular microenvironment*. Soumis à International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics le 23 juillet 2018
- Vincent Potiron, Karen Clément-Colmou, Emmanuel Jouglar, Manon Pietri, Sophie Chiavassa, Grégory Delpon, François Paris, Stéphane Supiot. *Tumor vasculature remodeling by radiation therapy increases doxorubicin distribution and efficacy*. Soumis à Cancer Letters le 19 septembre 2018

- **Communications orales :**

- Avril 2018 : 37ème congrès annuel de l'ESTRO « *Hypofractionated RT: fractionation schedule affects tumour vascular morphology and functionality* »
- Février 2018 : présentatrice invitée aux séminaires conjoints IRSN / CEA : « *Radiothérapie externe : impact du fractionnement sur le microenvironnement vasculaire tumoral* »
- Décembre 2017 : "les folles souris Nantaises" : « *Etude de l'impact de la radiothérapie externe sur le microenvironnement vasculaire tumoral : particularités des modèles animaux utilisés* »
- Septembre 2017 : Workshop international "Prediction and Modeling of response to Molecular and External Beam Radiotherapies" organisé par le Cancéropôle Grand Ouest, le Bono, France : « *Characterisation of tumour and microenvironment response to different hypofractionated radiotherapy schedules* »
- Avril 2017 : 7ème congrès de la Société Française d'Angiogenèse : « *Vascular remodeling induced by radiotherapy increases drug distribution and efficacy* »
- Novembre 2016 : Journées scientifiques de l'école doctorale Nantes-Angers : « *How is tumour vasculature modified with radiotherapy dose and fractionation?* »

- **Communications affichées :**

- Juillet 2018 : Congrès annuel du Cancéropôle Grand Ouest 2018 : Karen Clément-Colmou, Vincent Potiron, Maëva Guillonnet, Emmanuel Jouglar, Sophie Chiavassa, Gregory Delpon, François Paris, Stéphane Supiot. « *Modifications du microenvironnement vasculaire tumoral : impact du fractionnement de la radiothérapie* »
- Juin 2017 : Wolfsberg Radiobiology Meeting 2017 : Clément-Colmou K, Potiron V, Jouglar E, Guillonnet M, Paris F, Supiot S, « *Influence of radiation dose per fraction on tumour vasculature and hypoxia* »
- Avril 2017 : 7ème congrès de la Société Française d'Angiogenèse : Clément-Colmou K, Potiron V, Guillonnet M, Jouglar E, Paris F, Supiot S. « *Tumour vasculature morphology and functionality are modified according to radiotherapy fractionation* »

Table des matières

Remerciements	3
Articles, présentations orales et affichées de ces travaux :	5
Table des matières	7
Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Définition des acronymes	15
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART	17
1. <i>MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL</i>	17
1.1. PROPRIETES DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL	18
1.1.1. Vaisseaux tumoraux	18
1.1.1.1. Angiogenèse tumorale	18
1.1.1.2. Structure des vaisseaux tumoraux	21
Désorganisation architecturale	21
Faible couverture péricytaire	21
1.1.1.3. Fonctionnalité des vaisseaux tumoraux	24
1.1.2. Hypoxie tumorale	25
1.1.2.1. Origine et propriétés des zones hypoxiques	25
1.1.2.2. Composantes extravasculaires de l'hypoxie	27
Stress solide	27
Stress fluide	27
Consommation accrue	27
1.1.2.3. Conséquences de l'hypoxie	28
1.2. ROLE DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE AUX TRAITEMENTS ANTITUMORAUX	29
1.2.1. Mauvaise distribution des traitements systémiques	29
1.2.2. Résistance globale aux traitements anticancéreux	29
1.2.3. Résistance à l'immunothérapie	30
2. <i>FRACTIONNEMENT EN RADIOTHERAPIE</i>	30
2.1. RAPPEL DES PRINCIPES DE LA RADIOTHERAPIE	30
2.2. PRINCIPE DU FRACTIONNEMENT	31
2.2.1. Pourquoi fractionner la radiothérapie	31
2.2.2. La radiobiologie classique : alpha/beta, BED	32
2.3. SCHEMAS HYPOFRACTIONNES	33
2.3.1. Intérêt clinique des schémas hypofractionnés	33
2.3.2. Biologie des schémas hypofractionnés	33
3. <i>REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT</i>	35
3.1. REPONSE VASCULAIRE A L'IRRADIATION	35
3.1.1. Remodelage vasculaire radio-induit	35
3.1.2. Réponse à l'irradiation monodose	35
3.1.2.1. Mort radio-induite des cellules endothéliales	35
3.1.2.2. Effet d'une monodose sur l'oxygénation tumorale	35
3.1.3. Réponse à l'irradiation fractionnée	36
3.1.4. Remodelage vasculaire induit par l'irradiation normofractionnée	37
3.1.5. Origine des péricytes et voies impliquées dans le remodelage vasculaire	42
3.2. REVUE DE LA LITTERATURE : ROLE DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE A L'IRRADIATION 43	
INTRODUCTION	44
THE VASCULAR ENDOTHELIUM	45
<i>Role in immune-inflammatory cell recruitment</i>	45
<i>Importance of the endothelium glycome in endothelial-immune cell interactions</i>	46
RADIOBIOLOGY AND RADIOPATHOLOGY OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM	46
<i>Endothelial cell apoptosis and senescence</i>	47
<i>Endothelial activation</i>	48
<i>Radiotherapy and vascular changes in tumors</i>	48
<i>Radiation-induced vascular changes in normal tissues</i>	49
IMMUNOLOGICAL CONSEQUENCES OF RADIOTHERAPY	49
ENDOTHELIAL-ORIENTED STRATEGIES FOR THERAPEUTIC GAIN IN RADIATION ONCOLOGY	51

<i>Endothelial-oriented strategies to spare normal tissue</i>	51
Preventing endothelial cytotoxicity	51
Decreasing coagulopathy.....	52
Targeting premature endothelial senescence.....	52
Modulation of the immune-inflammatory response	52
<i>Endothelial-oriented strategies to target tumors</i>	53
Increasing injury to tumor vasculature	53
Cancer immunotherapy	53
Opening the endothelium for drug delivery	54
CONCLUSIONS	55
4. MODULATION DE L'HYPOXIE PAR L'IRRADIATION : COMPOSANTES EXTRAVASCULAIRES.....	61
4.1. LEVEE DU STRESS PHYSIQUE.....	61
4.2. MODIFICATION DU METABOLISME CELLULAIRE	61
Cellules tumorales.....	61
Cellules endothéliales	62
OBJECTIFS	63
MATERIEL ET METHODES	65
1. INFLUENCE DU SCHEMA DE FRACTIONNEMENT SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL	65
1.1. MODELES TUMORAUX.....	65
1.1.1. Choix des modèles	65
1.1.2. Lignées cellulaires et induction tumorale.....	65
1.2. CONSTRUCTION DU PLAN EXPERIMENTAL	65
1.3. TESTS DE SURVIE CLONOGENIQUE	66
1.4. RADIOTHERAPIE.....	66
Modalités d'irradiation	66
Schémas de fractionnement /étalement	67
1.5. HYPOXIE ET PERFUSION TUMORALES	67
1.6. IMMUNOHISTOCHEMIE.....	68
1.7. MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGE.....	69
1.8. STATISTIQUES.....	72
2. AUGMENTATION DE LA DISTRIBUTION ET DE L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE PAR LE REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT	72
2.1. MODELE LNCAP.....	72
2.2. RADIOTHERAPIE.....	72
2.3. TRAITEMENTS.....	72
3. ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE IN VIVO	73
3.1. MODELE ET PLAN EXPERIMENTAL	73
3.2. RADIOTHERAPIE.....	73
3.3. ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE ET PARAMETRES RECUEILLIS.....	73
4. MORT CELLULAIRE PRECOCE	75
5. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE.....	75
RESULTATS	77
1. INFLUENCE DU SCHEMA DE FRACTIONNEMENT SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL : ETUDE DESCRIPTIVE.....	77
1.1. EFFET DU FRACTIONNEMENT SUR LA CROISSANCE TUMORALE	77
1.2. EFFET DU FRACTIONNEMENT SUR LA DENSITE MICROVASCULAIRE.....	81
Densité microvasculaire à J14	81
Etude cinétique, modèle LLC.....	82
1.3. LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE LA COUVERTURE PERICYTAIRE, QUEL QUE SOIT LE SCHEMA DE FRACTIONNEMENT.....	82
1.4. AMELIORATION DE L'HYPOXIE ET DE LA PERFUSION, DE FAÇON DOSE ET TEMPS-DEPENDANTE	83
Hypoxie à J15	83
Etude cinétique, modèle LLC.....	85
Perfusion	86
INFLUENCE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT SUR LA DISTRIBUTION ET L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE	87
1.5. AMELIORATION RADIO-INDUITE DE LA PHYSIOLOGIE VASCULAIRE DANS DIFFERENTS MODELES TUMORAUX	87

1.6.	LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE LA DISTRIBUTION INTRATUMORALE DE DOXORUBICINE	92
1.7.	LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE	94
3.	IMAGERIE NON INVASIVE DU MICROENVIRONNEMENT PAR ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE	96
4.	MORT CELLULAIRE PRECOCE	99
5.	ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE	101
	Discussion Générale	103
1.	DENSITE MICROVASCULAIRE ET MORT RADIO-INDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES	103
1.1.	MORT CELLULAIRE ENDOTHELIALE	103
1.2.	IMPACT DU FRACTIONNEMENT SUR L'ENDOTHELIUM	104
2.	REPONSE DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE A LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE	105
2.1.	CONTRIBUTION DU COMPARTIMENT ENDOTHELIAL A L'AMELIORATION DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE	105
2.2.	CONTRIBUTION DES COMPARTIMENTS EXTRAVASCULAIRES A L'AMELIORATION DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE	106
2.2.1.	Impact de l'irradiation fractionnée sur les composantes extravasculaires de l'hypoxie	106
2.2.2.	Impact de l'irradiation fractionnée sur la repopulation, et les contraintes physiques	107
2.2.3.	Impact de l'irradiation fractionnée sur le métabolisme et la mort cellulaire tumorale	107
2.3.	CONTRIBUTION RELATIVE DES COMPOSANTES DU MICROENVIRONNEMENT A L'AMELIORATION DE L'HYPOXIE	108
2.4.	CINETIQUE DE REOXYGENATION	108
3.	PROGRES DANS LA CARACTERISATION DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO INDUIT	109
3.1.	Concept de normalisation vasculaire radio-induite	109
3.2.	INTERET THERAPEUTIQUE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO INDUIT	110
3.3.	ORIGINE DES PERICYTES TUMORAUX	111
3.4.	ROLE DES PERICYTES DANS LA NORMALISATION ET LA DISTRIBUTION D'AGENTS ANTICANCEREUX	111
4.	AUTRES MODIFICATIONS RADIO-INDUITES POUVANT INFLUENCER LA DISTRIBUTION D'AGENTS ANTICANCEREUX	112
	Perspectives	115
1.	MODELISATION DE LA REPONSE TUMORALE A LA RADIOTHERAPIE HYPOFRACTIONNEE	115
	Modélisations in silico de la réponse à l'irradiation	115
	Etude non invasive du microenvironnement vasculaire et hypoxique	115
2.	ROLE DES PERICYTES DANS LA REPONSE A L'IRRADIATION	116
3.	INFLUENCE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT SUR L'INFILTRAT IMMUNITAIRE	116
	Conclusion générale	119
	Bibliographie	121
	ANNEXES : articles soumis	133
2.	Article soumis à IJROBP	135
3.	Article soumis à cancer Letters	149

Liste des figures

Figure 1 : Modes de formation des vaisseaux (3)	19
Figure 2 : Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse (3)	20
Figure 3 : Désorganisation architecturale des vaisseaux tumoraux (7)	22
Figure 4 : Image de microscopie électronique de l'endothélium sain et tumoral (7)	23
Figure 5 : Images de microscopie électronique montrant la couverture péricytaire de vaisseaux tumoraux.....	24
Figure 6 : Les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux, conduisant à des zones d'hypoxie (3).....	25
Figure 7 : Voie de production de l'oxide nitrique et action sur les cellules musculaires lisses périverculaires (18)	26
Figure 8 : Représentation graphique du modèle linéaire quadratique et de l'effet du fractionnement de la dose (46).....	32
Figure 9 : Schématisation des effets de l'irradiation fractionnée selon le ratio α/β du type cellulaire...	33
Figure 10 : Maintien de la densité et de la distribution vasculaire en cours de radiothérapie normofractionnée (80)	39
Figure 11 : Amélioration de la couverture péricytaire et augmentation des jonctions inter endothéliales durant la radiothérapie normofractionnée de modèles de cancer de prostate PC3.....	40
Figure 12 : L'irradiation normofractionnée réduit l'hypoxie et accroît la perfusion tumorale dans un modèle de tumeur prostatique.....	41
Figure 13 : Schémas de fractionnement utilisés	67
Figure 14 : Image d'une coupe de tumeur PC3 (épaisseur 5 μm) en microscopie à fluorescence	70
Figure 15 : Image d'une coupe de tumeur LLC (épaisseur 5 μm) en microscopie à fluorescence.....	70
Figure 16 : Méthode d'analyse d'image semi-automatisée : exemple de recueil de l'index de couverture péricytaire αSMA par mesure de la surface $\alpha\text{SMA}+$ périverculaire.....	71
Figure 17 : Mesure du volume sanguin tumoral par échographie de contraste.....	74
Figure 18 : Paramètres recueillis en échographie de contraste.....	74
Figure 19 : Radiosensibilité intrinsèque des lignées PC3 et LLC	77
Figure 20: Effet du fractionnement sur la croissance des tumeurs PC3.....	79
Figure 21 : Effet du fractionnement sur la croissance des tumeurs LLC	80

<i>Figure 22 : Densité microvasculaire à J15</i>	<i>81</i>
<i>Figure 23 : Étude cinétique de la densité microvasculaire après 2 x 12 Gy, modèle LLC.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 24 : Couverture péricytaire à J15.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 25 : Hypoxie et perfusion à J15 dans les tumeurs PC3.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 26 : Hypoxie et perfusion à J15 dans les tumeurs LLC</i>	<i>85</i>
<i>Figure 27 : étude cinétique de l'hypoxie et de la perfusion dans le modèle LLC.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 28 : La radiothérapie fractionnée accroît la couverture vasculaire</i>	<i>88</i>
<i>Figure 29 : La radiothérapie fractionnée augmente la perfusion et réduit l'hypoxie</i>	<i>89</i>
<i>Figure 30 : Le remodelage vasculaire radio-induit n'est pas affecté par l'administration de sunitinib dans les tumeurs LLC.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 31 : La radiothérapie fractionnée accroît la distribution intratumorale de chimiothérapie</i>	<i>93</i>
<i>Figure 32 : L'amélioration de la distribution de doxorubicine n'est pas annihilée par le sunitinib.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 33 : L'amélioration de l'efficacité de la doxorubicine n'est pas annihilée par le sunitinib</i>	<i>95</i>
<i>Figure 344 : Représentation graphique des mesures réalisées par échographie de contraste en cours de radiothérapie normofractionnée sur le modèle PC3.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 35 : Mort cellulaire quatre heures après une dose unique d'irradiation</i>	<i>100</i>
<i>Figure 36 : Etude transcriptomique</i>	<i>101</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 : Etudes de l'impact de la radiothérapie monodose sur le microenvironnement vasculaire 36

Tableau 2 : Etudes de l'impact de la radiothérapie fractionnée sur le microenvironnement vasculaire
..... 37

Tableau 3 : Critères de normalisation vasculaire induite par les anti angiogéniques 42

Tableau 4 : Doses biologiques équivalentes..... 78

Définition des acronymes

ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ARn	Acide Ribonucléique
ANG-1	Angiopoïétine-1
ANG-2	Angiopoïétine-2
ARN	Acide Ribonucléique
ASMase	Acid Sphingomyelinase
ATP	Adenosine TriPhosphate
BED	Biological Equivalent Dose
BRCA1	Breast Cancer 1
CD31	Cluster Differentiation 31
CXCR4	CXC Receptor 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extra-Cellular Matrix
eNOS	Endothelial Nitric Oxid Synthase
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fas-L	Fas-Ligand
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GLUT1	Glucose Transport 1
HbEGF	Heparin-binding EGF-like Growth Factor
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
IGF1	insulin Growth Factor 1
IGF1R	insulin Growth Factor Receptor 1
IGFBP7	insulin Growth Factor Binding Protein 7
MMP	Matrix MetalloProtease
MMR	MisMatch Repair
NFKB	nuclear Factor Kappa-B
NG2	Neural/glial Antigen 2
NIH	national Institute of Health
NMRI	Naval Medical Research Institute
ORL	Oto-Rhino-Laryngologique
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDGFR β	Platelet-Derived Growth Factor Receptor β
PDGF β	Platelet-Derived Growth Factor β
PDL-1	Programmed Death Ligand 1
PEG	Polyethylene Glycol
PI	Perfusion Index
PIGF	Placenta Growth Factor
RPMI	roswell Parl Memorial Institute Medium
RT	Radiothérapie
SDF1	Stromal cell-derived Factor 1
TAM	Tumor Associated Macrophage
TEM	TIE-2 Expressing Macrophage
TTP	Time to peak
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WiAUC	Wash-in Area Under the Curve
Wir	Wash-in Rate
α SMA	α Smooth Muscle Actin

INTRODUCTION : ETAT DE L'ART

Alors que la radiothérapie est l'un des traitements les plus fréquemment employés contre le cancer, ses mécanismes d'action sont incomplètement élucidés. En particulier, les innovations technologiques de ces dernières décennies autorisent la délivrance de fortes doses d'irradiation dans un volume restreint, dont les conséquences biologiques sont différentes et mal connues. Ce travail de thèse propose d'avancer dans la connaissance des effets de l'irradiation à hautes doses par fraction sur le microenvironnement vasculaire. De nombreux champs de recherche tels que la biologie du cancer, la radiobiologie, la physique médicale et l'imagerie y sont abordés. Nous introduisons dans un premier temps les notions de microenvironnement vasculaire tumoral et de radiothérapie fractionnée, puis nous verrons comment la radiothérapie peut modifier le microenvironnement vasculaire et en quoi la connaissance de ces modifications est importante pour le traitement des cancers. Nous présenterons ensuite les objectifs, les méthodes, les résultats obtenus et publiés, ainsi que des résultats non publiés présentant un intérêt pour la poursuite des travaux. Nous discuterons de la pertinence et de la place des résultats obtenus dans le contexte scientifique et clinique. Enfin, nous présenterons des voies possibles pour poursuivre ces travaux avant de conclure sur les enseignements généraux tirés de cette expérience.

1. MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL

Les cancers sont la conséquence de la prolifération incontrôlée de cellules de l'organisme ayant subi une ou plusieurs mutations dérégulatrices. Dans les cancers solides, les cellules malignes insensibles aux signaux antiprolifératifs se présentent dans un premier temps sous la forme d'un amas tumoral. Cette tumeur, au fur et à mesure de sa croissance, devient invasive localement et à distance, libérant métastases ganglionnaires et systémiques conduisant au décès de l'hôte en l'absence de traitement efficace.

Dans les tumeurs solides, on distingue les clones de cellules transformées, cancéreuses à proprement parler, des cellules hôtes non transformées soumises aux besoins des cellules cancéreuses. Ces cellules normales sont détournées de leur fonction initiale et assujetties au cancer par différents mécanismes et contribuent à sa croissance et sa dissémination. Le microenvironnement tumoral est défini par l'ensemble des éléments constitutifs de la tumeur, autres que les cellules transformées. Parmi ces éléments, les vaisseaux sanguins interviennent dès les phases précoces du développement du cancer. L'apparition de néovaisseaux venant apporter à la tumeur nutriments et oxygène constitue le « switch angiogénique » qui définit le caractère invasif du cancer.

1.1. PROPRIETES DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL

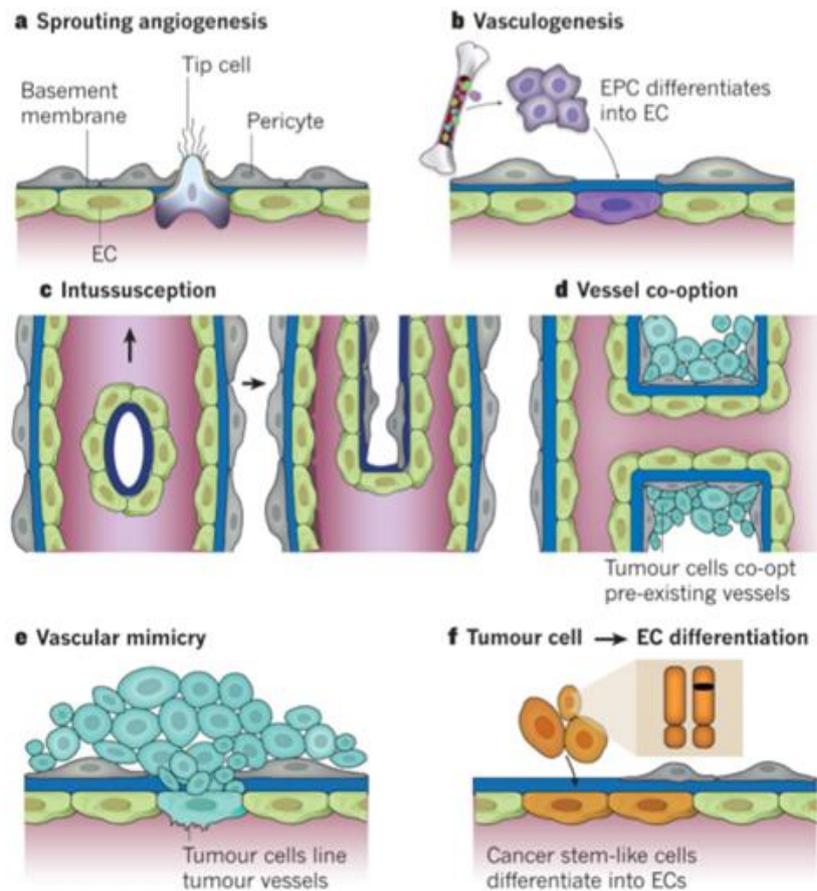
1.1.1. Vaisseaux tumoraux

1.1.1.1. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse se définit par la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. C'est un mécanisme physiologique permanent de l'organisme, utile notamment lors de la croissance et dans l'inflammation. C'est un processus complexe et ordonné qui met en jeu cytokines, facteurs de croissance, matrice extra cellulaire et de nombreux types cellulaires. Le moteur de l'angiogenèse est l'hypoxie. En situation d'hypoxie, les facteurs de croissance de type Hypoxia Inducible Factor (ou HIFs) sont exprimés par les cellules hypoxiques et orchestrent l'angiogenèse. La production d'un gradient de VEGF α et l'expression induite de VEGFR2 aboutissent à la « pousse » capillaire dont la cellule endothéliale de tête (« tip cell ») guide le cheminement, soutenue par la stimulation de la division et du recrutement cellulaire et par le remaniement matriciel des métalloprotéases. Une fois obtenue, la reperfusion permet la construction d'une membrane basale qui assure la quiescence des cellules endothéliales. La production de PDGF β permet le recrutement de péricytes qui soutiennent le flux sanguin des néocapillaires et les stabilisent, signant la fin du processus d'angiogenèse (1).

L'angiogenèse tumorale obéit aux mêmes mécanismes que l'angiogenèse physiologique. Cependant le stimulus hypoxique n'est pas compensé par la reperfusion, la tumeur elle-même sécrétant des facteurs inflammatoires et pro angiogéniques. La cascade angiogénique est alors permanente. Les cellules endothéliales, bien que d'origine saine, participent à la tumorigénèse et organisent le recrutement supplémentaire de cellules inflammatoires pro-angiogéniques d'origine médullaire (2). Le taux d'hypoxie reste élevé, soutenu par la croissance tumorale, et restreint l'hydroxylation inhibitrice des HIFs, maintenant ainsi la pression angiogénique (3). La libération de cytokines, facteurs de croissances et métalloprotéases par les fibroblastes et cellules immunitaires du stroma tumoral surajoute une ambiance inflammatoire favorable à l'entretien du processus d'angiogenèse (4)

Figure 1 : Modes de formation des vaisseaux (3)



Il existe plusieurs modes de formation des vaisseaux sanguins dans les tissus sains et les tumeurs.

(a) formation de vaisseaux par pousse angiogénique

(b) formation de vaisseaux par le recrutement de progéniteurs endothéliaux issus de la moelle osseuse ou résidents de la paroi vasculaire

(c) formation de vaisseaux par un processus de division vasculaire appelé intussusception

(d) Les cellules tumorales peuvent coopter les vaisseaux préexistants

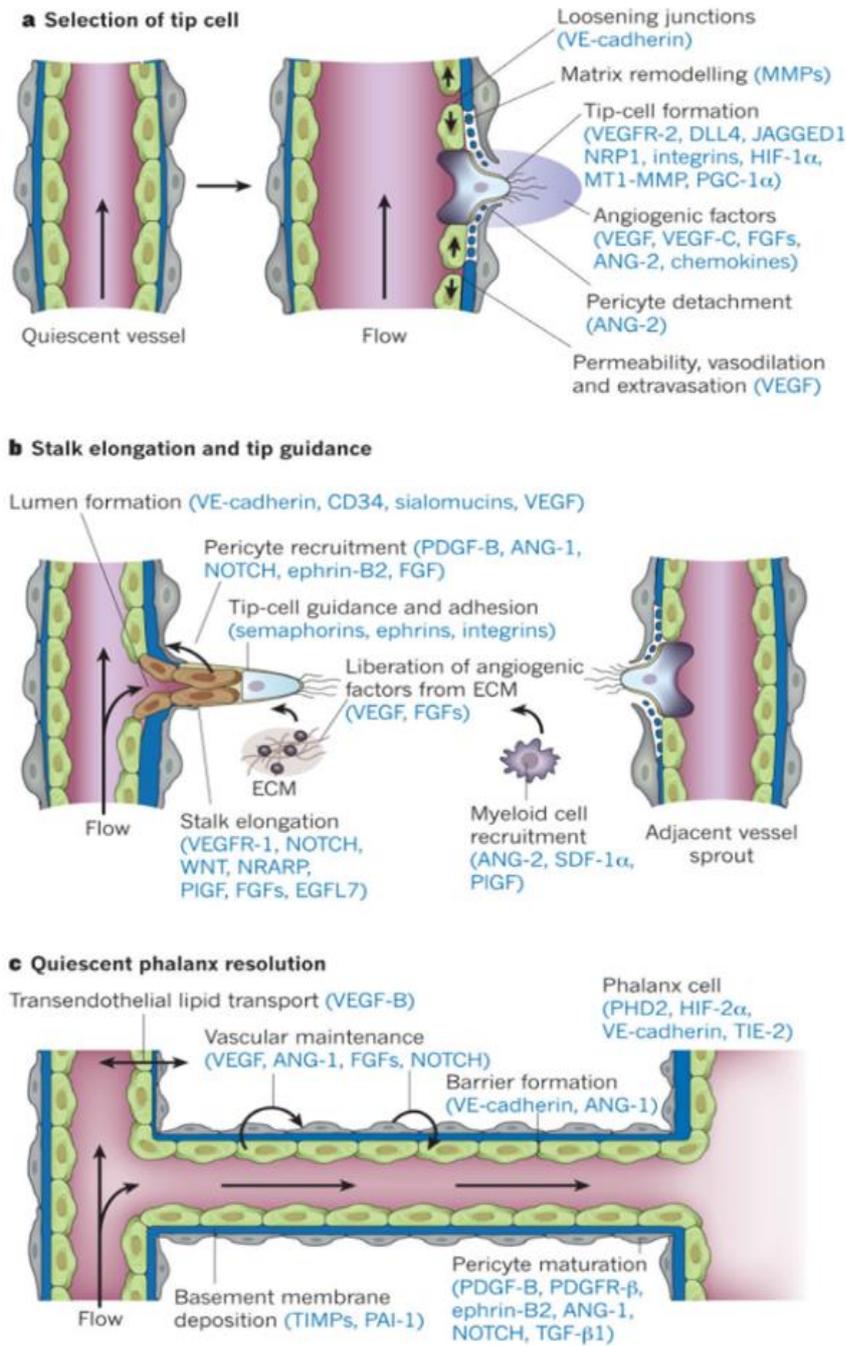
(e) Les vaisseaux tumoraux peuvent être bordés par des cellules tumorales, « vascular mimicry »

(f) Les vaisseaux tumoraux peuvent être bordés par des cellules endothéliales comportant des anomalies cytogénétiques, dérivant possiblement de cellules tumorales

Les tissus sains utilisent la pousse angiogénique, le recrutement de progéniteurs et l'intussusception (a-c)

Les tumeurs peuvent utiliser tous les modes de formation vasculaire (a-f)

Figure 2 : Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse (3)



Les étapes consécutives de la génération de néovaisseaux sont montrées avec les acteurs moléculaires clés.

(a) Après stimulation par les facteurs angiogéniques, le vaisseau quiescent se dilate et une cellule endothéliale de tête (« tip cell ») est sélectionnée pour assurer le branchement. La formation d'une « tip cell » requiert la dégradation de la membrane basale, le détachement des péricytes et le relâchement des jonctions cellulaires endothéliales. L'accroissement de la perméabilité permet l'extravasation de protéines du plasma (telles que fibrinogène ou fibronectine) déposant une couche provisionnelle de matrice extracellulaire. Les protéases remodelent la matrice préexistante, permettant la migration cellulaire. Pour simplifier, la membrane basale

est distincte des cellules endothéliales et des péricytes mais en réalité, les péricytes et cellules endothéliales y sont enchâssés.

- (b) La « tip cell » navigue en réponse aux signaux de guidage (comme les sémaphorines et éphrines) et adhère à la matrice extracellulaire via les intégrines pour migrer. Les cellules suivantes prolifèrent, s'allongent puis forment une lumière, et poussent jusqu'à fusionner pour perfuser le néovaisseau. Les cellules pariétales proliférantes attirent les péricytes et génèrent une membrane basale pour se stabiliser. Il se produit un recrutement de cellules myéloïdes telles que les macrophages associés à la tumeur (TAMs) ou les monocytes exprimant TIE-2 (TEMs), qui produisent ou libèrent des facteurs pro-angiogéniques de la matrice extracellulaire.*
- (c) Après fusion avec les branches voisines, la formation de la lumière permet la perfusion du néovaisseau, qui devient quiescent par la promotion d'un phénotype fusiforme, le rétablissement des jonctions, l'assise de membrane basale, la maturation des péricytes et la production de signaux de maintenance vasculaire. D'autres facteurs promeuvent le transport trans-endothélial de lipides.*

1.1.1.2. Structure des vaisseaux tumoraux

Désorganisation architecturale

Dans les tumeurs, la permanence de stimuli pro-angiogéniques désordonnés et l'absence de gradient de VEGF aboutissent à une angiogenèse désorganisée. Les vaisseaux sont déstructurés, d'architecture irrégulière et tortueuse (1). Leur paroi est incomplète par mauvais alignement endothélial. Certains vaisseaux peuvent être partiellement bordés par des cellules tumorales remplaçant les cellules endothéliales (« vascular mimicry »). La hiérarchie artérioveineuse et capillaire n'est pas respectée et des shunts existent, pouvant être le siège de microanévrismes (5).

Les contours vasculaires sont mal définis : d'une part, la monocouche endothéliale est irrégulière, lâche et fenêtrée. D'autre part, la membrane basale est présente mais anormale : d'épaisseur irrégulière selon la vitesse de croissance et la densité cellulaire, elle est fenêtrée, présente des formations sinusoïdes ou gloméruloïdes et des extensions dans le stroma (6). Cette membrane basale contient différentes formes anormales de fibronectine et de collagène IV et est elle-même source de facteurs angiogéniques et anti angiogéniques (7).

Faible couverture péricytaire

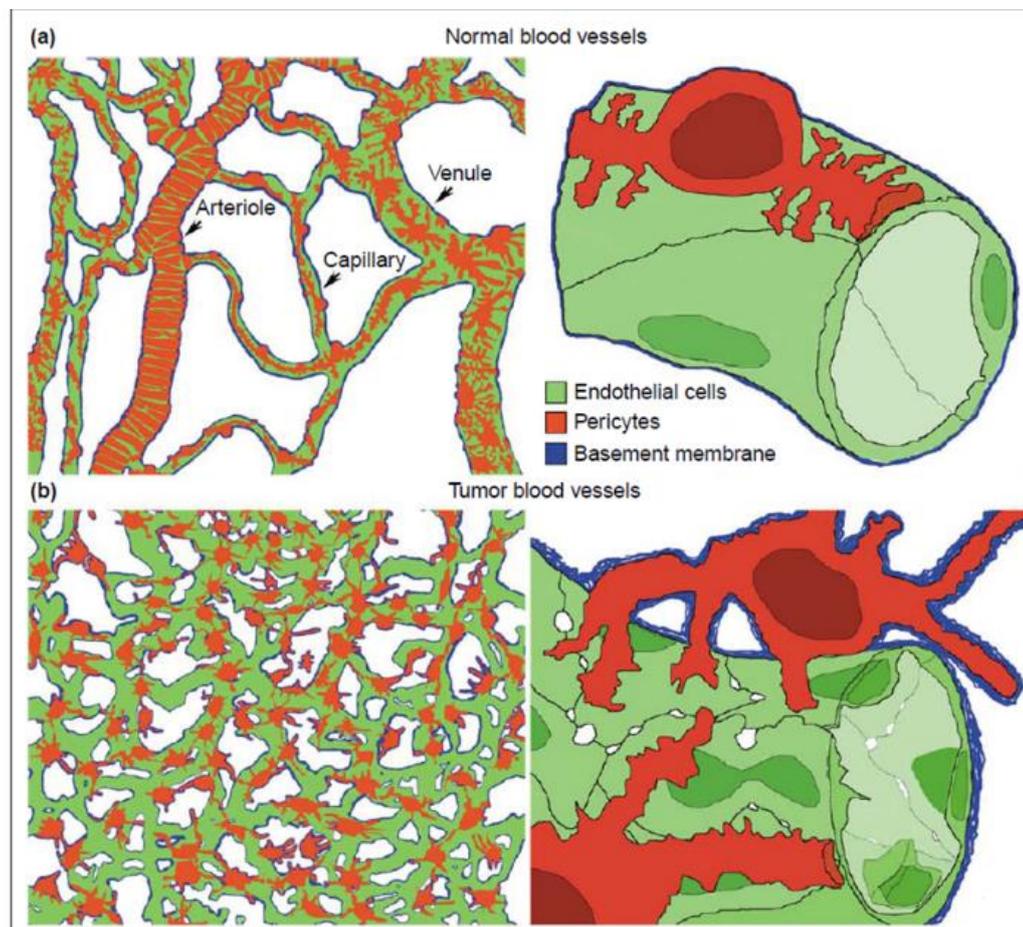
Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses murales, encastrées dans les cellules endothéliales, proches des cellules musculaires lisses périvasculaires. Ils sont recrutés via la production de PDGF β lors des phases finales du processus d'angiogenèse physiologique (8). Ils participent à la stabilisation des parois vasculaires et leur présence est indispensable au maintien d'un réseau vasculaire viable (9). Les vaisseaux tumoraux en sont faiblement pourvus et la modification des signaux membranaires endothéliaux affaiblit leur liaison à l'endothélium (10).

A l'état physiologique, les péricytes sont des acteurs critiques de la maturation vasculaire et de la fonctionnalité des vaisseaux. Lors de l'étape d'angiogenèse, les péricytes du stroma, activés par l'absence de liaison membranaire au PDGF β et par les molécules pro-angiogéniques, orchestrent la sécrétion de métalloprotéases, de VEGF, FGF et expriment NG2 en faveur de la prolifération endothéliale (11). La pousse vasculaire se poursuit jusqu'à engendrer une hyperoxygénation cellulaire qui sera le déclencheur de la migration des cellules α SMA-positives, futurs péricytes, vers les néovaisseaux. La fin de l'angiogenèse plastique est

marquée par la stabilisation des vaisseaux grâce à l'attachement fort du PDGFR β des péricytes au PDGF β des cellules endothéliales. En l'absence d'interaction forte, l'angiogenèse se poursuit de façon excessive (12).

Néanmoins, la nature des péricytes tumoraux n'est pas entièrement superposable à celle des péricytes régulateurs de l'angiogenèse physiologique. L'équipe de Kim et al fait état de péricytes dédifférenciés, exprimant PDGFR β mais n'exprimant pas les autres marqueurs usuels des péricytes matures (13). Malgré l'expression marquée du PDGFR β , la liaison des péricytes dédifférenciés aux vaisseaux est plus faible et favorable à la dissémination métastatique (14).

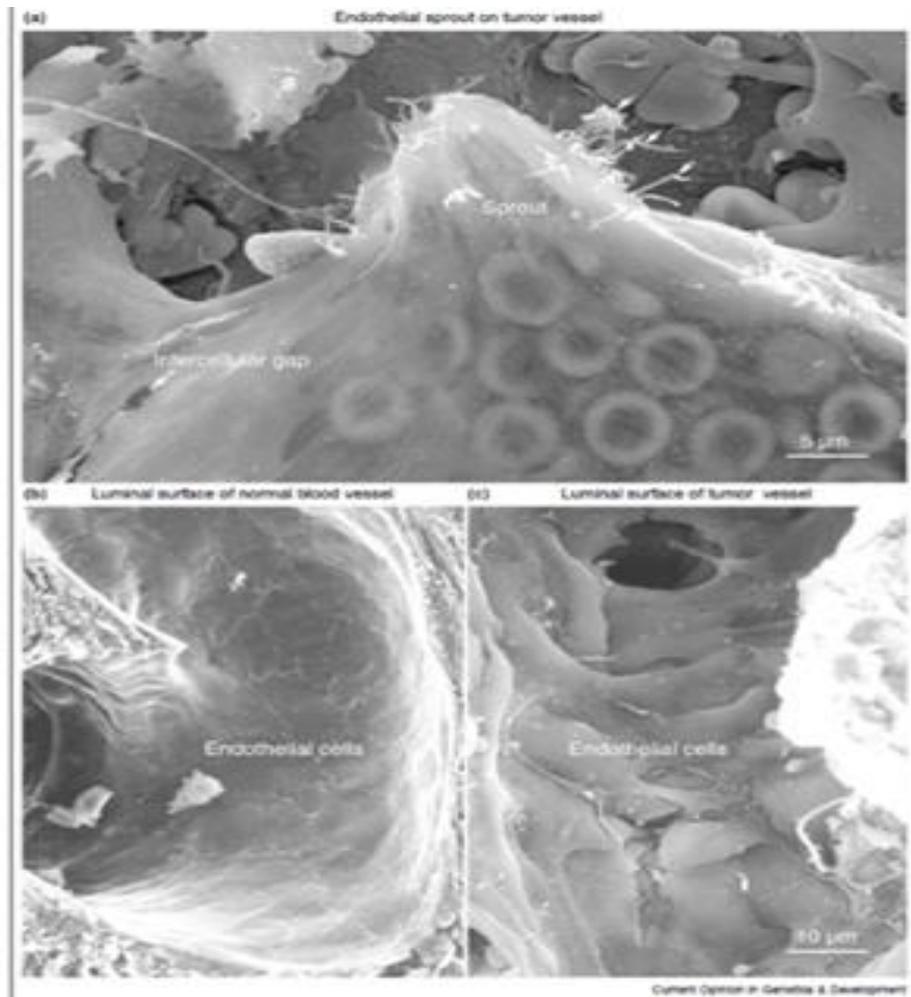
Figure 3 : Désorganisation architecturale des vaisseaux tumoraux (7)



Représentation schématique comparant la vascularisation d'un organe normal avec celle d'une tumeur solide. Tous les vaisseaux sanguins sont composés de cellules endothéliales (en vert), de cellules murales (en rouge) et d'une membrane basale (en bleu).

- (a) Réseau vasculaire normal montrant une hiérarchie d'artérioles, capillaires, veinules, dont les caractéristiques de taille, forme et structure sont bien définies. Les artérioles sont couvertes de cellules musculaires lisses, les capillaires et veinules sont bordés de péricytes. Une fine membrane basale entoure les cellules murales et endothéliales.*
- (b) Réseau vasculaire tumoral désorganisé et anastomotique, sans hiérarchie conventionnelle. Les artérioles, capillaires et veinules ne sont pas discernables per se. Des lacunes existent entre les cellules endothéliales. Les péricytes sont irréguliers et liés de façon lâche aux cellules endothéliales. La membrane basale peut être multicouche par endroit.*

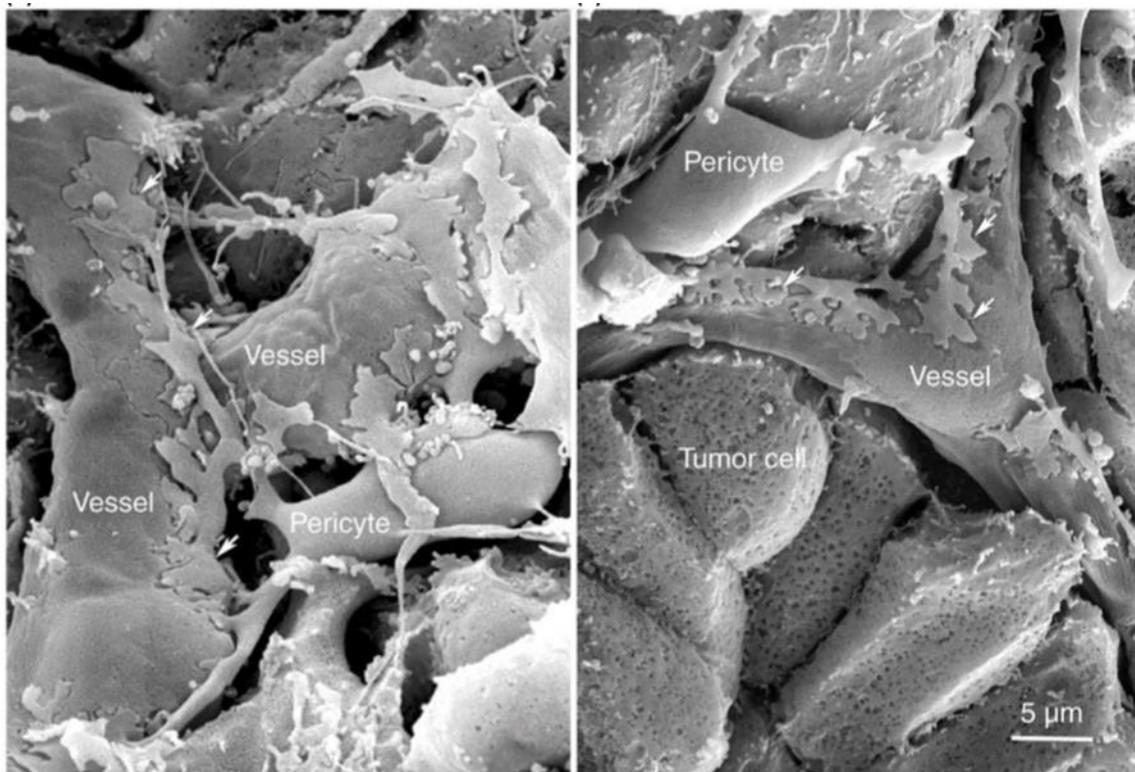
Figure 4 : Image de microscopie électronique de l'endothélium sain et tumoral (7)



- (a) Surface externe (abluminale) d'une pousse endothéliale issue d'un îlot pancréatique de souris transgénique RIP-Tag2. De multiples filopodes s'étirent de la surface endothéliale près de la tête du bourgeon vasculaire. Une lacune intercellulaire, montrant l'ouverture d'une jonction, est visible. Des érythrocytes sont visibles à travers l'endothélium mince et transparent.
- (b) Vaisseau normal : couche de cellules endothéliales lisse, régulière, jointive
- (c) Vaisseau d'une tumeur RIP-Tag2 : endothélium désorganisé.
- Le sang circulant a été exclu par la perfusion de fixateur.

Figure 5 : Images de microscopie électronique montrant la couverture péricytaire de vaisseaux

tumoraux



Les péricytes sont disposés sur la surface de vaisseaux tumoraux irréguliers, issus de souris RIP-Tag2. Reflétant leur association lâche avec les cellules endothéliales, le corps des péricytes n'est pas situé directement en contact avec la paroi vasculaire mais des processus membranaires (« flèches ») sont en contact avec les cellules endothéliales.

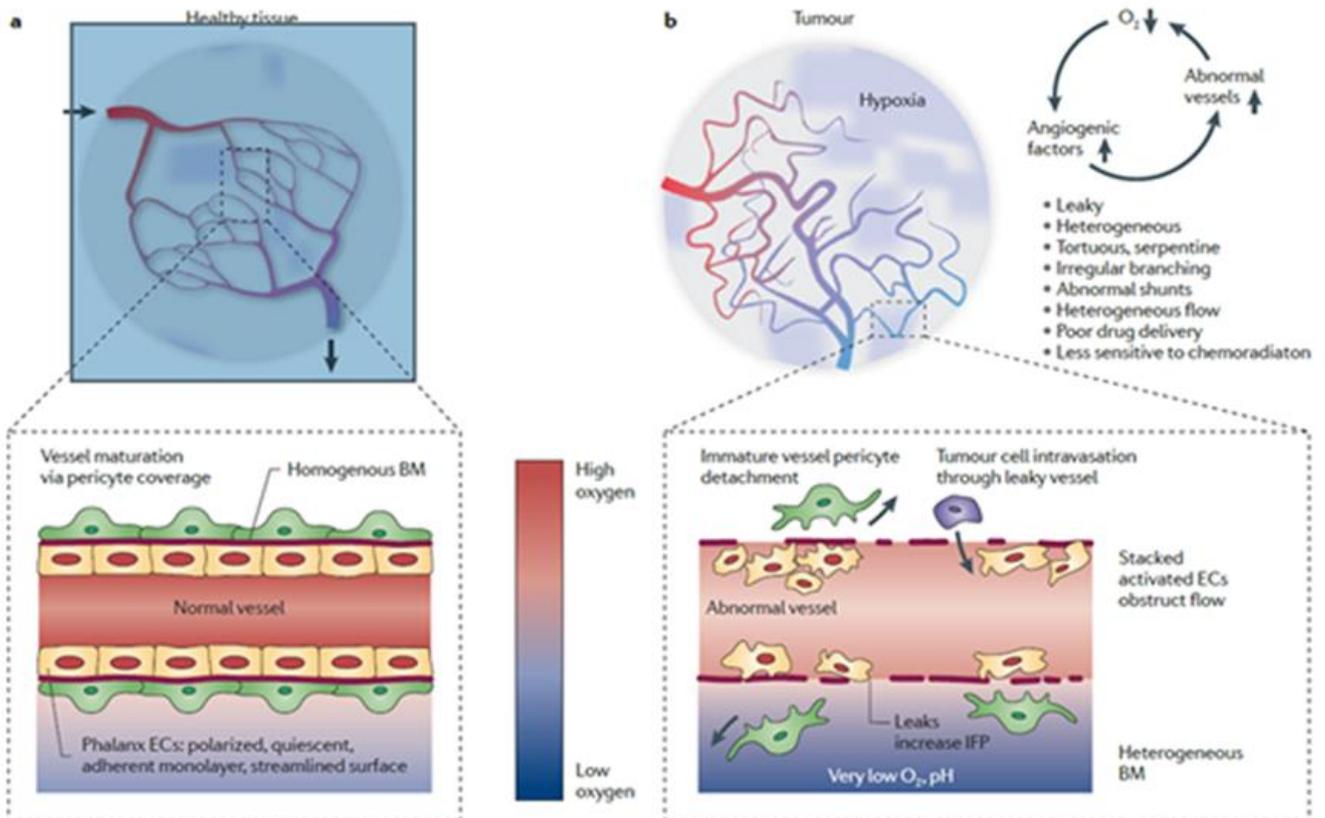
1.1.1.3. Fonctionnalité des vaisseaux tumoraux

La fonction principale des vaisseaux sanguins est l'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus irrigués. Dans les tumeurs, les anomalies développementales et structurelles limitent l'efficacité du réseau vasculaire pour cette fonction de base. Les vaisseaux borgnes et de calibre irrégulier conduisent à un flux sanguin instable en vitesse et en direction, voire des régurgitations. L'absence de contractilité vasculaire et de monocouche endothéliale stable conduisent à une fragilité des parois vasculaires et des micro saignements fréquents, assortis de microthrombi dans un contexte d'hyper-aggrégation plaquettaire (5).

L'hyperperméabilité vasculaire avec extravasations est source d'un déséquilibre des pressions de part et d'autre de la paroi vasculaire, avec une pression hydrostatique luminale faible et une pression interstitielle élevée par rapport aux tissus sains. La surface moyenne irriguée par un microvaisseau tumoral est particulièrement variable et plus restreinte en moyenne que pour les microvaisseaux normaux (6). De plus, les intégrines et récepteurs membranaires endothéliaux sont fréquemment sur ou sous-exprimés, modifiant l'adhésion et le transfert de molécules et les fonctions barrière ou transporteur de l'endothélium (7). D'autre part, le dialogue et la liaison altérés avec les péricytes limitent la contractilité capillaire et le

maintien de la régularité des flux sanguins, ainsi que la régénération tissulaire (10). En conséquence, la barrière hémato-tissulaire est moins nette et la transition épithélio-mésenchymateuse est dérégulée, favorisant la dissémination métastatique (15).

Figure 6 : Les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux, conduisant à des zones d'hypoxie (3)



(a) Dans les tissus sains se forme un maillage régulier de vaisseaux fonctionnels, dont la paroi et l'endothélium sont normaux et homogènes

(b) Dans les tumeurs solides, la vascularisation, comprenant aussi bien l'endothélium que les cellules pariétales et la membrane basale, montrent des anomalies structurelles et fonctionnelles, conduisant à des zones d'hypoxie sévère (représentées en nuances de bleu)

BM=membrane basale, EC=cellule endothéliale, IFP=pression fluide interstitielle

1.1.2. Hypoxie tumorale

1.1.2.1. Origine et propriétés des zones hypoxiques

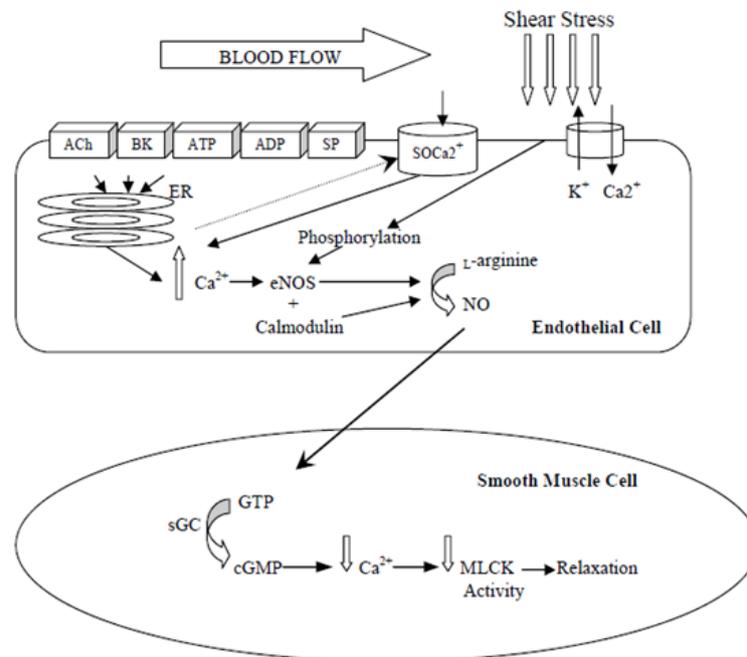
L'hypoxie tissulaire se définit par une pression partielle ou une disponibilité réduite du dioxygène qui restreint ou abolit le fonctionnement des organes, tissus ou cellules (16). Cette définition n'est pas complètement appropriée à l'hypoxie au sein des tumeurs solides, dans la

mesure où le fonctionnement cellulaire et tissulaire est constitutivement altéré dans ce contexte.

Dans les tumeurs, les anomalies structurelles et organisationnelles des microvaisseaux affaiblissent les capacités de perfusion et diminuent le rendement d'oxygénation tissulaire. Les anomalies pariétales et la faible couverture péricytaire sensibilisent les vaisseaux à la compression. La densité cellulaire tumorale et la prolifération rapide, l'excès de matrice et l'absence de vaisseaux lymphatiques sont sources d'une pression interstitielle intratumorale élevée qui majore l'effet de compression. L'hypoxie au sein des tumeurs est hétérogène et peut atteindre de très faibles pressions partielles en dioxygène. Elle peut être aiguë et/ou chronique et répartie en zones dynamiques et évolutives avec la croissance tumorale (17).

En situation physiologique, le flux sanguin est principalement régulé par les cellules endothéliales. Les forces de cisaillement générées par les variations de pression modulent l'influx calcique et la production d'oxyde nitrique (NO) par l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS). Le NO est une molécule vasodilatatrice recueillie par les péricytes et cellules musculaires lisses péryvasculaires, qui vont alors adapter leur relâchement à l'intensité du signal (18).

Figure 7 : Voie de production de l'oxyde nitrique et action sur les cellules musculaires lisses péryvasculaires (18)



Ach= acétylcholine, BK=bradykinine, ATP=adénosine triphosphate, ADP=adénosine diphosphate, SP=substance P, SOCa²⁺= canal ionique Ca²⁺ de stockage, ER=réticulum endoplasmique, NO=oxyde nitrique, sGC= guanylyl cyclase soluble, cGMP=guanosine 3'-5' monophosphate cyclique, MLCK=myosin light chain kinase

Lorsque les réserves de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique sont déplétées, un signal est envoyé au, canal SOCa²⁺ qui permet alors l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire dans la cellule endothéliale.

Dans les cellules endothéliales tumorales, suite à l'instabilité et l'excès d'angiogenèse, l'expression de eNOS est réprimée et les mécanismes de régulation sont altérés. De plus, dans des conditions normales, il existe un passage d'information entre cellules endothéliales et cellules périvasculaires d'amont en aval via le transfert de NO par les canaux ioniques et gap junctions, qui permet une régulation du flux sanguin à l'échelle du microvaisseau dans son ensemble. Au sein du cancer, l'absence de hiérarchie et de différenciation artérioveineuse empêche la propagation du signal et maintient les irrégularités et l'incohérence du flux. (19)

1.1.2.2. Composantes extravasculaires de l'hypoxie

Stress solide

La croissance incontrôlée des clones tumoraux et l'abondance de cytokines et signaux pro-inflammatoires conduisent à l'accumulation dense de cellules tumorales, cellules stromales et matrice extracellulaire dans un espace restreint. L'hyperpression membranaire des cellules tumorales induit une altération de l'expression génique, touchant les capacités cellulaires de prolifération, d'apoptose et d'invasivité. Le stress compressif permet l'émergence de cellules tumorales « leader » dont les propriétés de migration et d'invasion sont plus développées, qui rejoignent la circulation générale et peuvent engendrer des métastases à distance (20). La fonctionnalité des cellules stromales ainsi que la synthèse et l'organisation de la matrice extracellulaire sont également altérées par le stress solide, entretenant les signaux inflammatoires (21). Par ailleurs, le stress solide crée des zones de compression vasculaire sur des vaisseaux instables, favorisant les phénomènes d'hypoxie cyclique et la stimulation de l'angiogenèse. L'excès de stimulation angiogénique engendre l'édification de néovaisseaux mal structurés et peu résistants à la pression, qui à leur tour seront victimes de compression et de stase et vont entretenir la boucle de stimulation de l'angiogenèse (22).

Stress fluide

Le stress fluide est déterminé par l'effet combiné de la structure des vaisseaux et de leur compression. La pression intravasculaire faible et la tension interstitielle excessive accentuent les forces de cisaillement des flux sanguins sur les parois vasculaires, et renforcent la pression des flux interstitiels sur la matrice et les cellules tumorales (21). La stase des fluides intra et extravasculaires va également à l'encontre de la distribution de traitements systémiques (23). L'hypertension interstitielle, plus élevée au cœur de la tumeur, crée une sorte de gradient d'hypoxie favorable au développement de l'agressivité tumorale et à la génération d'une zone de « réserve » de cellules résistantes. Le gradient de pression permet également au fluide interstitiel chargé de cytokines et de facteurs de croissance et de résistance de se diffuser en périphérie et au pourtour de la tumeur, et de promouvoir ainsi l'agressivité et la diffusion métastatique au-delà des limites de la tumeur elle-même (24).

Consommation accrue

En sus du stress solide et du stress fluide, l'hypoxie est accentuée par les besoins en oxygène accrus des cellules cancéreuses. D'une part, les cellules tumorales sont plus nombreuses et plus denses que dans un tissu normal, augmentant le ratio des besoins par rapport à l'apport. D'autre part, leur prolifération rapide nécessite la mise en place d'un anabolisme intense et consommateur d'oxygène (25). Enfin, une grande partie des cellules cancéreuses sont dépendantes de la glycolyse aérobie, voie métabolique 18 fois moins

efficace que la phosphorylation oxydative (26). L'hypoxie elle-même favorise la sélection de cellules utilisant la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative, s'auto-entretenant en maintenant un niveau de consommation excessive (27).

1.1.2.3. Conséquences de l'hypoxie

Au sein des tumeurs solides, l'organisation et la structure anormales des vaisseaux tumoraux engendrent une grande hétérogénéité de perfusion sanguine. Les flux vasculaires peuvent être dynamiques ou statiques, voir rétrogrades, et sont variables dans le temps (28,29). La paroi vasculaire hyperperméable et fenêtrée laisse échapper le plasma, et la faible pression oncotique peut engendrer des situations de stase sanguine même si le vaisseau est perfusé (30). Les variations de perfusion dans le temps et l'espace font émerger des zones d'hypoxie chronique ou aigue intermittente. L'hypoxie aigue intermittente favorise la progression tumorale en favorisant l'instabilité génétique, l'inflammation et l'immunosuppression. L'hypoxie chronique favorise l'angiogenèse, la dédifférenciation cellulaire et l'émergence de cellules résistantes à la mort cellulaire par apoptose et autophagie.

En condition hypoxique, la production d'ATP par respiration mitochondriale est réduite en faveur de la glycolyse aérobie, processus moins efficace pour la génération d'ATP. L'utilisation préférentielle chronique de cette voie métabolique conduit à un déséquilibre ionique et une dépolarisation des membranes avec acidose intracellulaire. Le microenvironnement hypoxique, orchestré par la surexpression permanente des HIFs, vient modifier la régulation du cycle cellulaire. Si P53 est fonctionnelle, l'apoptose ou à la quiescence cellulaire pourront être induites. Dans le cas contraire, l'angiogenèse, l'expression de facteurs de croissance et de voies de survie et de résistance ainsi que la surexpression des transporteurs du glucose GLUT1 et 3 seront directement stimulés par HIF1 α (17). Mises en jeu par la pression hypoxique, les voies métaboliques stimulées sont intriquées à certaines voies de prolifération. Ainsi, au-delà de la survie à l'hypoxie qu'elles permettent, ces voies métaboliques orientent préférentiellement la cellule cancéreuse vers un processus prolifératif plutôt que vers un processus énergétiquement efficace. Ce phénomène est appelé « effet Warburg » et va à son tour entretenir l'hypoxie par majoration de l'apport sanguin nécessaire (31).

Les voies de survie activées par la surexpression de HIF1 α conduisent à la fois au shunt des points de contrôle du cycle cellulaire et à un défaut de certains systèmes de réparation des lésions de l'ADN. Additionnées à la pression proliférative, ces mécanismes aboutissent à un taux élevé de mutation et à une instabilité génétique et chromosomique favorables à l'émergence de nouveaux clones aux propriétés différentes (32).

Les péricytes sont également soumis aux effets de l'hypoxie. En contexte d'hypoxie chronique notamment, leur phénotype se modifie en faveur de l'expression de voies de migration et de déstabilisation endothéliale telles que NG2, VEGF, MMP1, soutenant l'angiogenèse et le processus de dissémination métastatique (11).

1.2. ROLE DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE AUX TRAITEMENTS ANTITUMORAUX

1.2.1. Mauvaise distribution des traitements systémiques

Les traitements administrés par voie générale tels que les chimiothérapies et thérapies ciblées sont une arme thérapeutique courante dans la lutte contre le cancer. Le rationnel de leur délivrance systémique se base sur leur sélectivité pour une propriété des cellules cancéreuses. Cette propriété peut être peu spécifique, comme une prolifération accrue, ou au contraire très spécifique comme le ciblage d'une protéine mutée particulière.

Les traitements systémiques parviennent à la tumeur par voie sanguine : la vascularisation tumorale anormale est à la fois le vecteur indispensable et un obstacle majeur pour la bonne distribution de ces thérapeutiques. L'architecture désorganisée, la faible pression hydrostatique intravasculaire, les fenestrations sont autant de limites à une distribution spatiale homogène des traitements. L'irrégularité de la membrane basale et la rareté de la couverture péricytaire augmentent la sensibilité des vaisseaux au stress solide, limitant physiquement le passage des molécules (21,33). Du fait de l'hyperperméabilité des vaisseaux tumoraux, la balance de pression est déséquilibrée et limite la distribution d'agents thérapeutiques à un diamètre de 15 microns ou moins autour des capillaires, d'autant plus restreint que le poids moléculaire est élevé (34). La mauvaise pénétration intratumorale des chimiothérapies limite alors leur efficacité de façon pondérée par le stade tumoral et la densité vasculaire (35).

Au-delà des contraintes physiques, les cellules endothéliales elles-mêmes endossent un métabolisme hyperglycolytique et consomment l'oxygène et les nutriments de façon supérieure à la normale, limitant encore l'accès en profondeur des traitements et majorant la barrière endothélio-cellulaire (36). De plus, la faible couverture péricytaire et la dédifférenciation des péricytes tumoraux réduit la réponse à certaines chimiothérapies, en particulier aux anthracyclines (13).

1.2.2. Résistance globale aux traitements anticancéreux

L'instabilité génétique mutagène et l'altération des systèmes de réparation de l'ADN dus à l'hypoxie aboutissent à l'émergence sélective de clones mutants plus résistants à la mort cellulaire (37). L'altération des systèmes de détection et de réparation de l'ADN limite la sensibilité de ces nouveaux clones aux traitements ciblant l'ADN. Lorsque l'hypoxie est profonde et chronique, les zones hypoxiques peuvent également constituer une niche de cellules moins proliférantes, donc moins sensibles aux traitements spécifiques du cycle cellulaire. De plus, l'acidification du pH dénature les antimétabolites. Certaines chimiothérapies comme la bléomycine ou l'étoposide ont une action réduite en l'absence d'oxygène (32).

Les cellules endothéliales cancéreuses stimulent également la résistance aux traitements. En leur sein, la répression de l'anti-oncogène IGFBP7 et la surexpression d'IGF1 liée aux altérations métaboliques, conduit les cellules tumorales exprimant IGF1R à une dédifférenciation vers un phénotype souche chimiorésistant (38). L'expression endothéliale de FAK (Focal Adhesion Kinase) active également la voie de survie NF κ B dans les cellules

tumorales (39). De même, le profil cytokiniques des cellules endothéliales cancéreuses favorise la résistance à la radiothérapie(40).

Outre les propriétés des cellules tumorales telles que l'instabilité génétique sélectionnant des clones radiorésistants et la synchronisation du cycle en phase radiorésistante, l'efficacité de la radiothérapie en elle-même est impactée en condition hypoxique. La raréfaction de l'oxygène limite le stress oxydant et les lésions de l'ADN qui en découlent, en particulier les cassures double brin. La répression des mécanismes MMR et BRCA1 de détection et de réparation des lésions de l'ADN réduit la possibilité d'activation de p53. En parallèle, le niveau ambiant élevé d'enzymes de réparation et l'abondance des complexes protéiques liés à l'ADN limitent les lésions et la mort cellulaire radio-induites (41).

1.2.3. Résistance à l'Immunothérapie

Les immunothérapies, administrées pour la plupart de manière systémique, se fondent sur la restauration et l'amplification de l'immunité antitumorale spécifique innée. Ainsi, l'infiltration de la tumeur par les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés est nécessaire à son efficacité. L'endothélium est un acteur central de l'inflammation et du recrutement immunitaire, impliquant la capture, l'adhésion et la transmigration des leucocytes jusqu'à la tumeur. La dénaturation des molécules de surface endothéliales induites par la stimulation angiogénique permanente limite l'accès à la tumeur (42). L'expression de Fas-L par les cellules endothéliales est également possible (43).

Le microenvironnement hypoxique tumoral est également immunosuppresseur en lui-même. Le taux élevé de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF, polarise les cellules inflammatoires et conduit à l'inactivation de la réponse immunitaire (44). De plus, HIF1 α induit la surexpression de PDL-1, ligand inactivateur des lymphocytes T cytotoxiques (45).

2. FRACTIONNEMENT EN RADIOTHERAPIE

2.1. RAPPEL DES PRINCIPES DE LA RADIOTHERAPIE

La radiothérapie est l'administration à visée thérapeutique de rayonnements ionisants. Les rayonnements ionisants sont des émissions de particules chargées ou non (photons, électrons, protons, neutrons etc.) dont l'énergie est suffisante pour provoquer des ionisations, c'est-à-dire des transferts de charge électronique, au sein du milieu qu'elles traversent. La radiothérapie est dite externe si la source radioactive est située en dehors de l'organisme, interne si la source est injectée ou placée à l'intérieur du patient. Selon le type d'utilisation souhaitée, le type de source radioactive et sa demi-vie d'activité sont différents. Ici, nous parlerons uniquement de radiothérapie externe. Le champ d'utilisation médicale de la radiothérapie externe est quasi-exclusivement limité à la cancérologie. Les principaux types de rayonnements utilisés sont les photons X, largement majoritaires, les électrons, les protons et certaines particules lourdes. Les rayons X sont générés à partir des photons de freinage d'un faisceau d'électrons accéléré par un champ électromagnétique puissant, au sein d'un accélérateur linéaire. L'avantage de ces accélérateurs est la possibilité de moduler le niveau d'énergie utilisé, donc la profondeur de pénétration des rayonnements, et l'absence de source radioactive permanente dont le contrôle et le recyclage sont moins aisés.

En cancérologie, le principe de la radiothérapie est le suivant : la délivrance de rayonnements ionisants crée un stress oxydant cellulaire responsable de lésions directes et indirectes de l'ADN, notamment de cassures double brin irréparables, dont la sévérité ou l'accumulation provoquent la mort de la cellule par incapacité à se diviser. L'irradiation est locale ou locorégionale, strictement limitée aux zones cibles définies par l'oncologue-radiothérapeute, avec une précision de 10 à 1 millimètres selon les accélérateurs. L'unité de dose utilisée est le Gray (Gy), correspondant à un transfert énergétique de 1 joule/kg. A l'heure actuelle, les doses utilisées en pratique clinique courante vont de 20 à 80 Gy selon les indications. Les indications principales sont le traitement curatif ou palliatif des tumeurs malignes de l'adulte, en particulier du sein, de la prostate, du poumon, des sphères ORL, gynécologique, neurologique et digestive. Dans ce cadre, la radiothérapie peut être associée de façon séquentielle ou concomitante aux traitements systémiques du cancer comme la chimiothérapie, les thérapies ciblées ou l'immunothérapie.

2.2. PRINCIPE DU FRACTIONNEMENT

2.2.1. Pourquoi fractionner la radiothérapie

L'efficacité de l'irradiation dans la lutte anti-cancéreuse est connue et utilisée depuis près de 120 ans. L'utilisation de sources radioactives au débit progressivement décroissant, le manque de précision des outils de mesures physiques et la difficulté des calculs dosimétriques ont conduit à la mise en place de nombreuses précautions de sécurité. La limitation de l'irradiation au strict volume tumoral est en effet impossible, et aux doses tumoricides, les lésions créées aux tissus sains peuvent avoir des conséquences graves voire mortelles comme le syndrome gastro-intestinal ou l'agranulocytose. Le fractionnement de l'irradiation a permis de limiter ces effets secondaires tout en conservant une efficacité antitumorale grâce à l'exploitation des capacités différentes de réparation des lésions de l'ADN entre les cellules tumorales et les cellules saines. Ainsi, la répartition temporelle de la dose non pas en une seule mais en de multiples séances espacées de plusieurs heures permet aux cellules saines d'exploiter leur machinerie physiologique de réparation de l'ADN. A l'inverse, schématiquement, les cellules cancéreuses subissant des dommages sont plus orientées vers les voies de survie que d'arrêt du cycle cellulaire. La sollicitation de la machinerie de réparation est moins systématique, plus lente et moins efficace. Cette orientation préférentielle leur procure un avantage sélectif pour la mutagenicité et l'expansion clonale du cancer. Dans ces conditions, la répétition de l'irradiation exerce une « pression lésionnelle » qui provoque l'accumulation de dommages létaux ou potentiellement létaux et, à défaut de conduire la cellule vers une apoptose défailante, rend la mitose impossible au cycle suivant ou après quelques cycles.

De surcroît, la prolifération excessive rend les cellules tumorales plus sensibles aux dommages radio-induits, les cellules en cycle étant plus radiosensibles. L'écart idéal entre deux fractions, qui permet d'un côté une réparation optimale des cellules saines, et de l'autre évite le recouvrement des cellules cancéreuses, se situe entre 6 et 30 heures (46). Le rythme d'une séance quotidienne a ainsi été généralement admis. Bien sûr, cet effet différentiel est à pondérer selon la vitesse de prolifération et la radiosensibilité intrinsèque du tissu sain concerné.

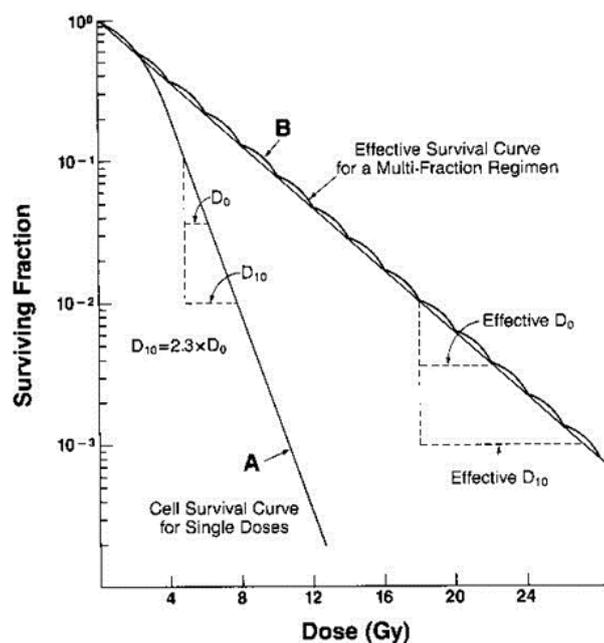
2.2.2. La radiobiologie classique : alpha/beta, BED

Afin de prédire d'une façon plus générale la sensibilité au fractionnement à l'échelle tissulaire, des modèles mathématiques ont été élaborés à partir de courbes de survie cellulaire obtenues in vitro. Le modèle le plus couramment admis est le modèle linéaire quadratique, dont l'équation est la suivante :

$$(S) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Où D est la dose délivrée, α est la capacité du modèle cellulaire à réparer les lésions de l'ADN et β la sensibilité aux lésions sublétales. Logiquement, le paramètre α est donc plus élevé dans les cellules saines et le paramètre β est plus élevé pour les tissus proliférant rapidement. A partir de cette équation appliquée au type cellulaire choisi, on peut alors définir un ratio α/β inversement proportionnel à la sensibilité du tissu au fractionnement.

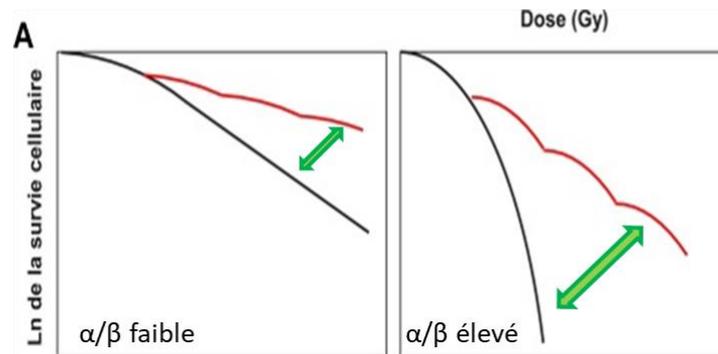
Figure 8 : Représentation graphique du modèle linéaire quadratique et de l'effet du fractionnement de la dose (46)



La courbe A représente l'effet de la dose délivrée en une seule fraction. La survie clonogénique suit la courbe répondant à l'équation du modèle quadratique.

La courbe B représente l'effet de la dose délivrée en fractions quotidiennes de 2 Gy. Entre chaque séance, une partie des dommages de l'ADN est réparée, permettant une meilleure survie clonogénique.

Figure 9 : Schématisation des effets de l'irradiation fractionnée selon le ratio α/β du type cellulaire



A gauche : ratio α/β faible, l'effet du fractionnement est limité et la survie clonogénique est d'autant plus proche de la courbe linéaire quadratique représentant une dose unique que le ratio se rapproche de zéro

A droite : ratio α/β élevé, plus la dose est fractionnée, plus les cellules se réparent entre chaque fraction. La survie clonogénique est améliorée par rapport à la courbe linéaire quadratique représentant une dose unique.

2.3. SCHEMAS HYPOFRACTIONNES

2.3.1. Intérêt clinique des schémas hypofractionnés

De nos jours, les équipements de radiothérapie permettent une précision de plus en plus pointue. Les accélérateurs sont d'une précision millimétrique concernant la délivrance géographique de la dose et d'une grande fiabilité concernant l'énergie et le débit de dose. L'imagerie multimodale, la modulation d'intensité et le contrôle du positionnement sous l'appareil permettent de réduire considérablement le volume et la dose reçue par les tissus sains péri tumoraux (47). Dans ce contexte de précision stéréotaxique, l'effet différentiel devient moins nécessaire et l'utilisation de schémas hypofractionnés, utilisant des doses par séance supérieures à 2 Gy, devient envisageable. Le côté pratique évident de ces schémas, limitant les allées et venues des patients et l'encombrement des machines, a motivé leur introduction et leur généralisation rapide en pratique courante. Outre les indications palliatives, les traitements par radiothérapie hypofractionnée sont désormais admis comme équivalents au standard dans le traitement curatif de nombreuses localisations tumorales comme la prostate (48), le poumon (49) ou le foie (50). A titre d'exemple, des doses de 2.5 à 5 Gy par fraction ont montré une survie sans récurrence non inférieure par rapport au schéma normofractionné dans le cancer de la prostate localisé (51–53). Dans les cancers bronchiques non à petites cellules de faible volume, des essais cliniques utilisant des doses telles que 12 à 18 Gy par fraction, délivrées dans des conditions stéréotaxiques, ont montré une survie comparable à la chirurgie (54).

2.3.2. Biologie des schémas hypofractionnés

La transposition de schémas conventionnels reconnus comme efficaces et éprouvés en schémas hypofractionnés n'est pas aisée. Afin d'obtenir une équivalence de dose, on utilise

par convention une formule établie à partir du modèle linéaire quadratique. La dose biologique équivalente ou BED représente la dose qui correspondrait si un nombre infini de fractions infiniment petites étaient données (55). Elle se calcule à partir de la formule suivante :

$$BED = dose\ totale \times \left(1 + \frac{dose\ par\ fraction}{\alpha/\beta}\right)$$

Le choix de la dose par fraction est plus empirique et tient compte de la proximité de tissus sains et de la sensibilité du type tumoral au fractionnement. Bien que mathématiquement calculable, la transposition pratique d'un schéma à l'autre reste pleine d'incertitudes. En effet, la formule ne tient pas compte du temps inter-fraction et son respect strict pour une équivalence de dose exacte imposerait un étalement identique pour un schéma normo ou hypofractionné. En pratique, un temps inter-fraction trop important pourrait faire perdre le bénéfice de l'augmentation de dose en termes de repopulation tumorale (47). De plus, la validité du modèle pour des doses par fraction supérieures à 7 Gy est controversée (56,57). Pour ces fortes doses, les courbes de survie clonogéniques obtenues *in vitro* présentent des écarts de 6 à 40% avec la survie théoriquement attendue (58). De plus, ces écarts apparaissent différents, voire contradictoires selon leur mesure précoce ou tardive (59).

Au-delà des écarts obtenus sur les cultures cellulaires qui peuvent paraître acceptables dans certaines conditions, l'impact des variations de doses sur le microenvironnement tumoral n'est pas pris en compte par le modèle. L'hypoxie et l'effet de réoxygénation radio-induit sont pourtant sources de différences majeures entre les résultats extrapolés et les effets constatés chez l'humain ou l'animal (58,60). De plus, plusieurs études récentes montrent que les réactions immunitaires sont drastiquement différentes pour les fortes doses par fraction et peuvent influencer la réponse tumorale (61–63).

3. REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT

3.1. REPONSE VASCULAIRE A L'IRRADIATION

A l'occasion d'une radiothérapie externe, les cibles de l'irradiation sont les cellules cancéreuses. Néanmoins, les cellules malignes sont situées au sein de la tumeur et de son microenvironnement. La vascularisation tumorale reçoit la même dose que l'ensemble de la tumeur. L'irradiation provoque des modifications des vaisseaux qui impactent leur fonctionnalité oxygénative et distributive, et peuvent influencer la disponibilité et l'efficacité de traitements systémiques ou de la radiothérapie elle-même. Les paragraphes suivants font la synthèse des modifications vasculaires radio-induites observées dans la littérature et leur impact sur la perfusion et l'oxygénation à l'échelle tissulaire.

A l'inverse, la présence de cellules endothéliales influence la réponse de la tumeur elle-même à l'irradiation, ainsi que la réaction immuno-inflammatoire locale et systémique. La revue de la littérature présentée en seconde partie fait état du rôle biologique de l'endothélium dans la réponse tumorale à la radiothérapie, tout en développant particulièrement les aspects immuno-inflammatoire de cette réponse.

3.1.1. Remodelage vasculaire radio-induit

Les études concernant l'impact de l'irradiation sur le microenvironnement vasculaire tumoral sont hétérogènes, tant dans les modèles que dans les doses et les méthodes utilisés. Il en sort que la radiothérapie induit d'une part des modifications morphologiques des vaisseaux, portant sur le nombre (densité microvasculaire) et la couverture péricytaire des vaisseaux tumoraux, et d'autre part des modifications fonctionnelles de la perfusion sanguine et de l'hypoxie tumorale (64–66,66–88).

3.1.2. Réponse à l'irradiation monodose

3.1.2.1. Mort radio-induite des cellules endothéliales

La sensibilité des cellules endothéliales tumorales *in vivo* à de fortes doses d'irradiation est peu connue, difficile à étudier, et objet de controverses. Dans un modèle sous-cutané de fibrosarcome, une vague d'apoptose des cellules endothéliales a été décrite après une irradiation monodose de 11 Gy, d'importance croissante avec la dose. Cette vague de mort cellulaire n'était pas observable pour des doses de 7 Gy et inférieures (76). De même, une apoptose massive des cellules endothéliales intestinales saines, dépendante de l'ASMase, a été décrite 4 heures après irradiation, observable à partir de doses comprises entre 7 et 11 Gy (89). A l'encontre de ces résultats, dans un modèle de tumeur bronchique, aucune réduction de la densité vasculaire n'était observable après 15 Gy bien que des taux élevés de caspase 3 clivée aient été décrits dans les cellules endothéliales (68).

3.1.2.2. Effet d'une monodose sur l'oxygénation tumorale

La majorité des études associant irradiation et mesure de l'hypoxie tumorale utilise une seule séance de radiothérapie à une dose variable, et décrit un impact négatif de l'irradiation sur la fonction d'oxygénation : augmentation de l'hypoxie tumorale et réduction de la perfusion,

qui semble plus marquée pour les fortes doses. Néanmoins, ces conclusions sont à reprendre avec précaution compte-tenu de l'hétérogénéité des modèles et méthodes. L'incohérence globale des résultats de densité microvasculaire et de couverture péricytaire, rendant toute conclusion globale impossible, témoigne encore de cette hétérogénéité.

Tableau 1 : Etudes de l'impact de la radiothérapie monodose sur le microenvironnement vasculaire

Etude	Dose	Modèle	MVD	Couverture péricytaire	Hypoxie	Perfusion	Methode de mesure hypoxie /perfusion	Date de mesure
Crokar 2005	2Gy	fibrosarcome/hepatocarcinome			↘transit.	↗transit.	doppler et sonde oxymétrique	jusqu'à 72h post RT
Klug 2013	2Gy	insulinome	↘				NA	J7 post RT
Jani 2015	2Gy	neuroblastome	stable	stable		↘	echographie de contraste	6h post RT
Maeda 2016	4Gy	pancreas BxPC3					HIF1/doppler	jusqu'à J14 post RT
Sonveaux 2002	6Gy	hepatocarcinome TLT			↘	↗	doppler et sonde oxymétrique	jusqu'à 72h post RT
Song 2016	10Gy	fibrosarcome FSall	stable		stable	stable	pimonidazole/hoechst /TEP F-miso	J0, J2, J6 post RT
Bussink 2000	10Gy	ORL			↗	↘	pimonidazole/hoechst	jusqu'à J11 post RT
Okubo 2016	12Gy	ORL	↘		↗		pimonidazole	J15 post RT
Maeda 2016	12Gy	pancreas BxPC3	↘				HIF1/doppler	jusqu'à J14 post RT
Jan 2013	12Gy	poumon LLC	↘transit.	↗	↗		pimonidazole	j3,J8, J15 post RT
Jani 2015	12Gy	neuroblastome	↘	↘		↘	echographie de contraste	6h post RT
Wang 2015	14Gy	poumon LLC	↘	↗			NA	jusqu'à 120h post RT
Roe 2012	15Gy	prostate CWR22	stable		stable	↘	Pimonidazole/hoechst/DCE-iRM	24h post RT
Song 2015	15Gy	poumon LLC	↘transit.		↘transit.	↘	pimo, hoechst FACS	J0,J2,J3, J5 post RT
Garcia-barros 2003	15Gy	Fibrosarcome/melanome	↘				immunohistochimie	0 à 24h post RT
Kioi 2010	15Gy	glioblastome			↗	↘	pimonidazole/echographie de contraste	J14 post RT
Ogawa 2007	15Gy	lignées FSC1 et T53	↘				NA	J5 post RT
Song 2016	20Gy	fibrosarcome FSall	↗		↗	↘	pimonidazole/hoechst /F-miso	J0, J2, J6 post RT
Maeda 2016	24Gy	pancreas BxPC3	↘		↗		HIF1/doppler	jusqu'à J14 post RT
Chen 2009	25Gy	prostate TRAMPc1	↘		↘transit.		pimonidazole/hoechst	jusqu'à J14 post RT

3.1.3. Réponse à l'irradiation fractionnée

La répartition de la dose totale en plusieurs séances, ou fractionnement de la dose, est plus proche de la pratique clinique quotidienne en radiothérapie. Bien que variables dans leurs modèles également, les conclusions des études concernées sont plus consensuelles. Dans ces études, les vaisseaux tumoraux sont moins nombreux ou en quantité stable selon la dose par fraction, mais présentent une couverture péricytaire plus abondante et la perfusion sanguine est augmentée. Les mesures d'hypoxie et de perfusion présentent des résultats plus hétérogènes, dont on retient une tendance globale à l'amélioration après irradiation fractionnée.

Tableau 2 : Etudes de l'impact de la radiothérapie fractionnée sur le microenvironnement vasculaire

Etude	Dose	Modèle	MVD	Couverture péricytaire	Hypoxie	Perfusion	Methode de mesure hypoxie /perfusion	Date de mesure
Crocart 2005	2x2Gy	fibrosarcome/hepatocarcinome			↘	↗	doppler/sonde oxymétrique/ bleu patent	jusqu'à 72h post RT
Potiron 2013	10x2Gy	prostate PC3	stable	↗	↘	↗	EF5/hoechst	jusqu'à 72h post RT
Kane 2015	10x2Gy	poumon LLC	↘	↗	↗		pimonidazole	NP
Bayer 2012	10x2Gy	ORL 6 lignées			↗		pimonidazole/ hoechst	24h post RT
yaromina 2011	15x2Gy	ORL 6 lignées	stable		↘	stable	pimonidazole/hoechst	24h post RT
Chen 2009	15x4Gy	prostate TRAMPc1	↘		stable		pimonidazole/hoechst	jusqu'à J14 post RT
Chen 2013	15x4Gy	prostate TRAMPc1	↘	↗	↘	↗	pimonidazole/hoechst	NP
Ceelen 2006	5x5Gy	adenocarcinome colo-rectal	↘		↗		pimonidazole/sonde oxymetrique/IRM	J5 post RT
Fenton 2016	5x6Gy	sein mCa4 et mCa35	↘		↗		EF5/diOC7	J2 post RT
Hu 2016	5x7.5 Gy	ORL Fadu			stable		sonde oxymétrique	pendant RT
Hu 2017	5x9.5Gy	ORL Fadu			stable		sonde oxymétrique	pendant RT
Hu 2018	5x13.5Gy	ORL Fadu			↘		sonde oxymétrique	pendant RT
Frenzel 2017	5x10Gy	poumon OH1	↘				NA	J9 post RT
Lan 2013	3x12Gy	poumon LLC	↘	↗	↘		pimonidazole	j3,J8, J15 post RT
Crocart 2005	2x2Gy	fibrosarcome/hepatocarcinome			↘	↗	doppler/sonde oxymétrique/ bleu patent	jusqu'à 72h post RT
Potiron 2013	10x2Gy	prostate PC3	stable	↗	↘	↗	EF5/hoechst	jusqu'à 72h post RT
Kane 2015	10x2Gy	poumon LLC	↘	↗	↗		pimonidazole	NP
Bayer 2012	10x2Gy	ORL 6 lignées			↗		pimonidazole/ hoechst	24h post RT
yaromina 2011	15x2Gy	ORL 6 lignées	stable		↘	stable	pimonidazole/hoechst	24h post RT
Chen 2009	15x4Gy	prostate TRAMPc1	↘		stable		pimonidazole/hoechst	jusqu'à J14 post RT

3.1.4. Remodelage vasculaire induit par l'irradiation normofractionnée

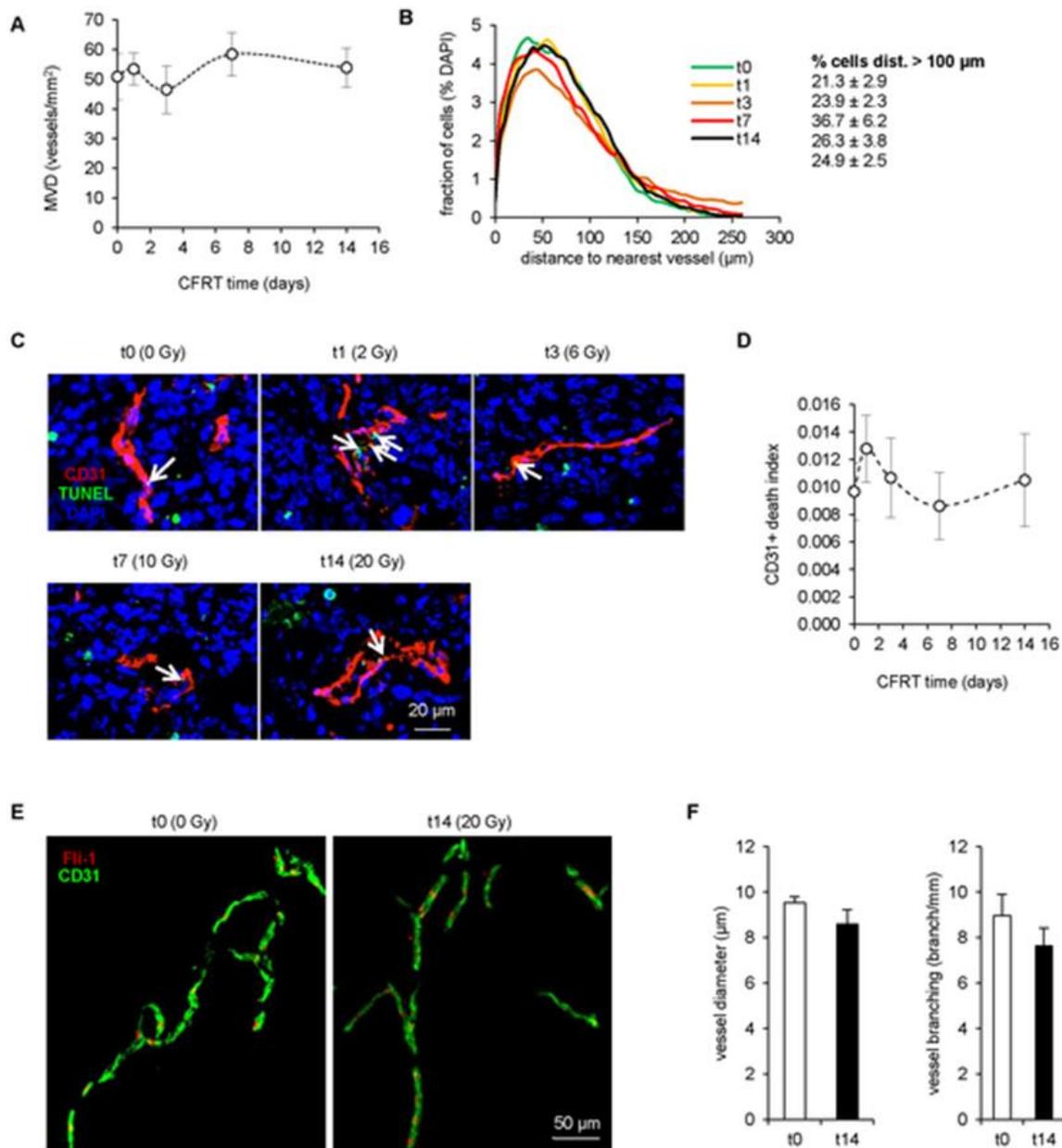
Nettement moins de données sont disponibles pour ce qui concerne les effets d'une radiothérapie normofractionnée. Les travaux précédents de l'équipe ont décrit l'impact du schéma de fractionnement le plus courant en pratique clinique (radiothérapie normofractionnée : 2 Gy par jour, 5 jours par semaine) sur le microenvironnement vasculaire, dans un modèle de cancer de prostate humaine (80). Après deux semaines d'irradiation, la densité microvasculaire n'était pas significativement modifiée. En revanche, le nombre de péricytes périvasculaires et de jonctions serrées inter-endothéliales était augmenté. En parallèle, l'hypoxie tumorale sévère était réduite, et la perfusion sanguine ainsi que la distribution intratumorale de dextrans de taille variée étaient significativement majorées.

Ce remodelage vasculaire radio-induit s'apparente à une maturation de microvaisseaux initialement altérés. Un phénomène similaire a été décrit après l'administration d'agents anti-angiogéniques : dans une « fenêtre de normalisation vasculaire », les vaisseaux retrouvent transitoirement un phénotype plus mature et une fonctionnalité améliorée associée à une réduction de l'hypoxie tumorale, avant d'être détruits par la stimulation anti-angiogénique prolongée (90). La normalisation vasculaire induite par les anti-angiogéniques a été largement décrite et mise à profit pour améliorer la distribution et l'efficacité des chimiothérapies (36,91,92). Ses caractéristiques principales sont résumées dans le tableau qui suit. La mise à profit de la réduction de l'hypoxie tumorale pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie a

été suggérée mais la durée limitée de la fenêtre face à l'étalement sur plusieurs semaines de radiothérapie rend cette application plus difficile (93).

De façon intéressante, des travaux portant sur les vaisseaux cérébraux sains (qui à l'état physiologique ont une faible couverture péricytaire) montrent également un recrutement de péricytes après irradiation normofractionnée. Ce recrutement se faisait parallèlement au recrutement d'autres cellules inflammatoires issues de la moelle osseuse et son mécanisme n'a pas été identifié, l'inhibition de la voie SDF1/ CXCR4 ne le modifiant pas (94).

Figure 10 : Maintien de la densité et de la distribution vasculaire en cours de radiothérapie normofractionnée (80)



(A) Densité microvasculaire tumorale en cours de radiothérapie normofractionnée. Les valeurs représentent la moyenne sur n=13 par point pendant 6 semaines

(B) Profil de distance entre les cellules et le vaisseau le plus proche pendant les 2 semaines de radiothérapie normofractionnée. Les profils sont faits sur une base n=13, les comparaisons statistiques sont par rapport à t0.

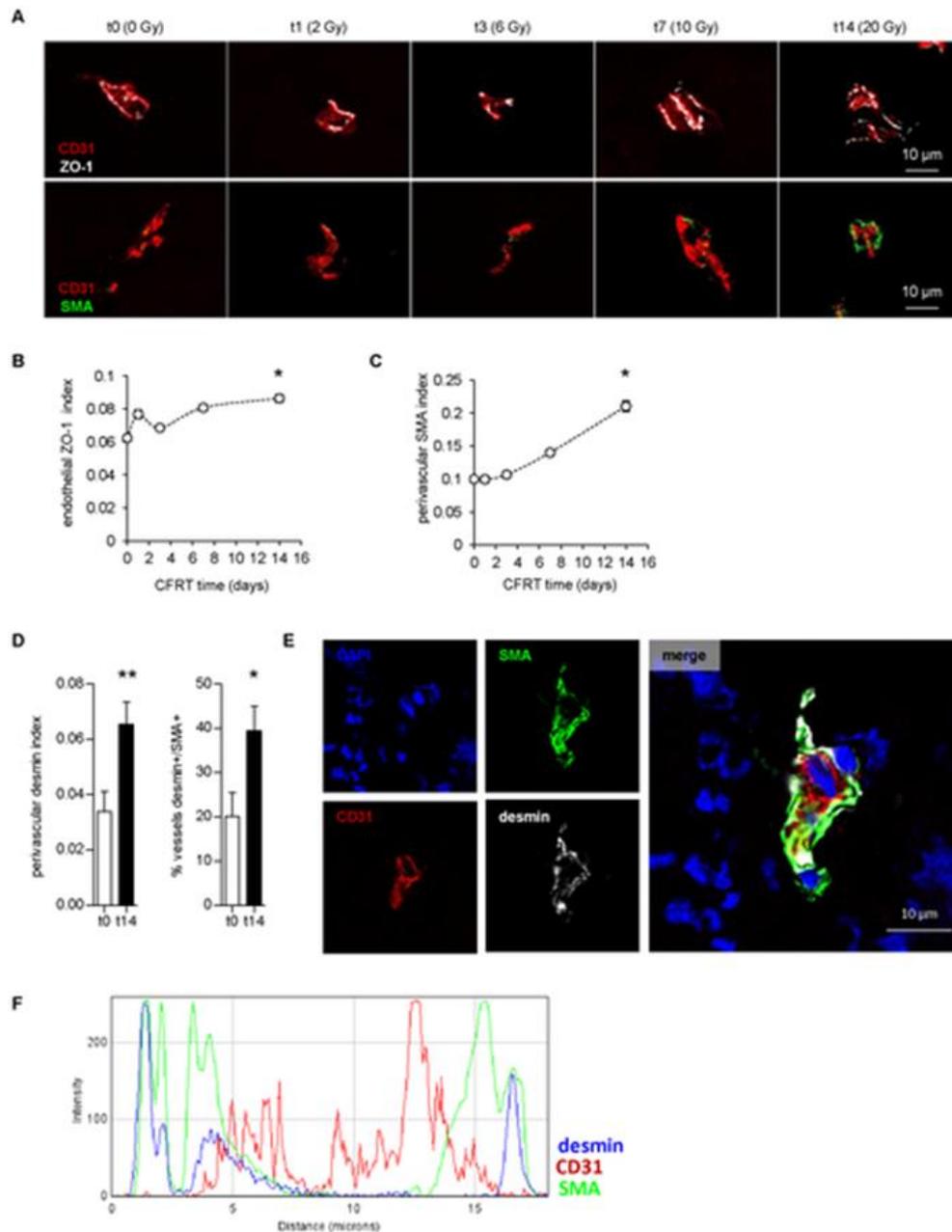
(C) Images pseudo-confocales de vaisseaux tumoraux (CD31+) marqués par TUNEL pendant la radiothérapie normofractionnée. Flèches = cellules TUNEL+/CD31+

(D) Quantification de la surface CD31+/TUNEL+ sur l'image, n=13/point

(E) Images de dimension Z de sections tumorales de 100 µm d'épaisseur avant (t0) ou après 2 semaines de radiothérapie normofractionnée (t14). Marquage des vaisseaux sanguins (CD31+/Fli-1+)

(F) Analyse des images du réseau vasculaire sur les sections tumorales de 100 µm d'épaisseur. Moyennes obtenues pour n=9 par point

Figure 11 : Amélioration de la couverture péricytaire et augmentation des jonctions inter endothéliales durant la radiothérapie normofractionnée de modèles de cancer de prostate PC3



(A) Images pseudo-confocales de vaisseaux sanguins tumoraux en cours de radiothérapie normofractionnée et marquées avec ZO-1/CD31 (haut) or SMA/CD31 (bas)

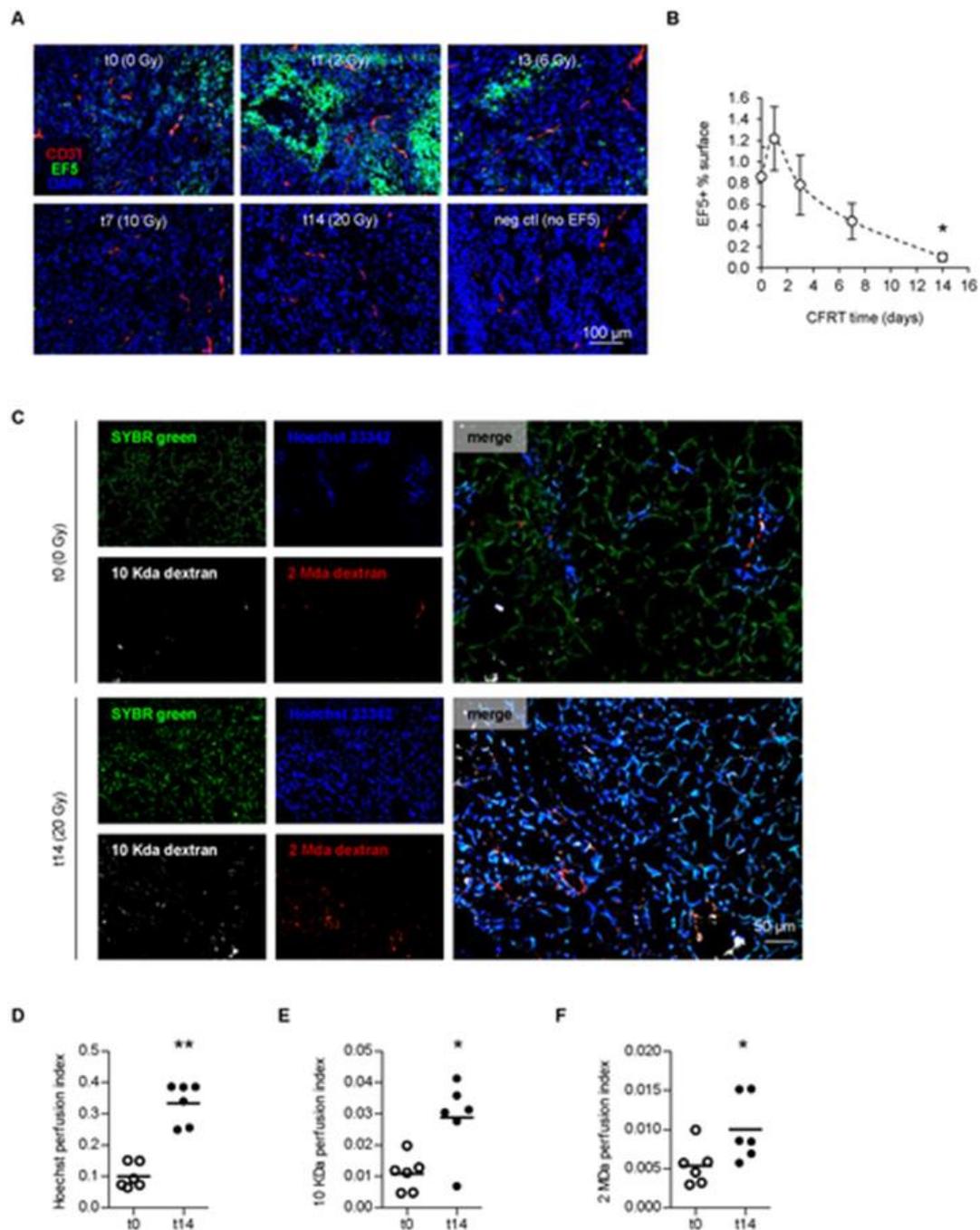
(B,C) Quantification du signal ZO-1+/CD31+ à partir des images (B) and surface SMA péri-CD31+ (C). Valeurs obtenues sur n=13 par point

(D) Quantification de la surface de signal desmin péri-CD31+ et fréquence des vaisseaux desmin+/SMA+

(E) Images confocales représentatives d'un vaisseau sanguin issu d'une tumeur prélevée à J14 en cours de radiothérapie normofractionnée et marquée avec CD31/desmin/SMA.

(F) Analyses spectrales des profils de marquage CD31/desmin/SMA sur une section de l'image confocale

Figure 12 : L'irradiation normofractionnée réduit l'hypoxie et accroît la perfusion tumorale dans un modèle de tumeur prostatique



(A) Images pseudo-confocales des tumeurs en cours de radiothérapie normofractionnée, marquée pour l'hypoxie (EF5) et les cellules endothéliales (CD31)

(B) Quantification de la surface EF5+ sur les images des tumeurs en cours de radiothérapie normofractionnée. N=13 par point

(C) Images pseudo-confocales de tumeurs perfusées par Hoechst 333421 et dextrans de 2 et 20 kDa avant (t0) ou après (t14) 2 semaines de radiothérapie normofractionnée. Le contre marquage nucléaire était réalisé à l'air de SYBR-green.

(D,E,F) Quantification de la surface perfusée par le Hoechst 33342(D), le dextran moyen (E) et le dextran lourd (F) avant et après radiothérapie normofractionnée (n=6, comparaison à t0)

Tableau 3 : Critères de normalisation vasculaire induite par les anti angiogéniques (95)

Properties	Vessel type	
	Tumor (untreated)	Tumor (normalized)
Global organization	Abnormal	Normalized
Pericyte	Absent or detached	Closer to normal
Basement membrane	Absent or too thick	Closer to normal, some ghost
Vessel diameter	Dilated	Closer to normal
Vascular density	Abnormal, heterogeneous distribution	Closer to normal
Permeability to large molecules	High	Intermediate
MVP and IFP	MVP ~ IFP	MVP > IFP
Plasma (P) and interstitial (I) oncotic pressure*	P ~ I	P > I
pO ₂	Hypoxia	Reduced hypoxia

3.1.5. Origine des péricytes et voies impliquées dans le remodelage vasculaire

L'origine des péricytes est encore mal connue, qu'il s'agisse de péricytes physiologiques ou associés au cancer. L'hypothèse la plus communément admise serait qu'il s'agit de cellules mésenchymateuses qui viennent se condenser autour des vaisseaux sous l'effet du PDGF β (96,97). Aucun marqueur commun et spécifique des péricytes n'a pu être décrit à ce jour, pouvant faire supposer une certaine plasticité de ce type cellulaire. Les péricytes pourraient même constituer une niche périvasculaire de cellules souches mésenchymateuses (10).

Si la voie du PDGF β a été souvent décrite comme principale voie de recrutement des péricytes, certaines voies alternatives induites par l'irradiation comme par exemple SDF1/CXCR4 ou HbEGF ont également été décrites comme impliquées dans le recrutement péricytaire. Ces voies ne semblent pas impliquées de façon constante mais plutôt dépendantes des voies d'activation oncogéniques de la tumeur en réponse à l'irradiation (98). La voie de la sphingosine-1-phosphate (S1P), fortement impliquée dans la réponse endothéliale à l'irradiation, pourrait également participer au recrutement des péricytes. Le récepteur S1P1 des cellules endothéliales est en effet un régulateur la maturation vasculaire : son absence lors de l'angiogenèse embryonnaire a pour conséquence une couverture vasculaire déficiente (99). Or, la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation est caractérisée par une mobilisation en excès de la voie membranaire de la sphingomyélinase acide (ASMase), responsable de la génération de S1P pouvant conduire pour les fortes doses jusqu'à l'apoptose (100). En l'absence d'apoptose, la stimulation de S1P1 pourrait conduire au recrutement péricytaire.

Les péricytes ont également été mis en cause dans les réactions de fibrose radio-induite comme l'athérosclérose ou la fibrose pulmonaire, par le biais de mécanismes inflammatoires non complètement élucidés (101). L'infiltration locale massive de myofibroblastes inflammatoires, décrite suite à la radiothérapie mais également lors de nombreux phénomènes inflammatoires peu spécifiques, pourrait être issue de la différenciation des péricytes (102). D'autres hypothèses considèrent également la possibilité d'une différenciation des cellules endothéliales elles-mêmes (transition endothélio-mésenchymateuse) sous l'influence des signaux inflammatoires mais également des péricytes (103). L'implication de voies de recrutement péricytaire comme SDF1/CXCR4 ou S1P, stimulées de façon répétée à chaque séance de radiothérapie, fait supposer le principe de remaniements dynamiques entretenus par le maintien de l'irradiation (84).

3.2. REVUE DE LA LITTÉRATURE : ROLE DU MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE A L'IRRADIATION

*Article paru dans le British journal of Radiology de septembre 2018
BJR 91(1089):20170762. doi: 10.1259/bjr.20170762. Epub 2018 Apr 20.(104)*

REVIEW ARTICLE

Importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy

Running title: The irradiated vascular endothelium as a checkpoint of immune response

Olivier Guipaud¹, PhD, Cyprien Jaillot¹, PhD, Karen Colmou², MD, Agnès François¹, PhD, Stéphane Supiot², MD, PhD, and Fabien Milliat¹, PhD

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SERAMED, LRMed, Fontenay-aux-Roses, France.

²Institut de Cancérologie de l'Ouest, Département de Radiothérapie, Nantes St-Herblain, France.

ABSTRACT

Ionizing radiation induces acute and late injuries that are dose-limiting factors in radiotherapy. Tissue injury, inflammation and infection are all associated to infiltration of immune-inflammatory cells from the blood and/or the lymph circulation. Damaged cells from the tissues and immune-inflammatory resident cells release factors that attract cells from the circulation, leading to the restoration of tissue balance by fighting against infection, elimination of damaged cells and healing of the injured area. When exposed to high doses of radiation, normal tissues that surround the tumors develop an immune-inflammatory reaction in response to tissue injury. This reaction can turn out to be chronic and deleterious for the concerned organ, potentially leading to fibrosis and/or necrosis of the irradiated area. Tumors also trigger an immune-inflammation reaction, which can be initialized and amplified by cancer therapy such as radiotherapy, although immune checkpoint often allow many cancers to be protected by inhibiting the T cell signal. Altered by ionizing radiation, the vascular network is considered as a prime target to limit normal tissue damage and improve tumor control in radiotherapy. Irradiation damages and/or activates endothelial cells which then participate in the recruitment of circulating cells, especially by overexpressing cell adhesion molecules, but also by other as yet unknown mechanisms. Herein, we have explored the involvement of vascular endothelium in the fate of healthy tissues and tumors undergoing a radiotherapy. This review also covers current researches that take advantage of the radiation-induced response of the vasculature to spare healthy tissue and/or better target tumors.

INTRODUCTION

All tissues can be damaged by ionizing radiation beyond a dose-volume threshold.¹ The damage results from the initial deposition of energy within the tissue. The processes of radiation injury begin at once after the irradiation, but some of the clinical and histological signs such as necrosis and fibrosis cannot become visible before weeks, months, or even years after a therapeutic treatment.^{1,2} Damages are characterized by cell death, phenotypic changes, immune-inflammatory cell infiltration, vascular and tissue remodeling, which can lead to chronic injury and ultimately necrosis.

Radiotherapy (RT) is used to treat a variety of cancers, as well as benign tumors, in more than half of patients with tumors.³ Despite great advances in radiation dose delivery techniques, the therapeutic index of RT is still limited by normal tissue injury in organs at risk and by the radiation resistance of some tumors.⁴ New approaches to optimize the response of normal tissue and tumors thus remain essential for improving the outcome of RT, by increasing the likelihood of cancer cure or by decreasing normal tissue toxicity, or both.^{5,6}

In the vessels, the endothelium is a key cell compartment for the response to ionizing radiation of healthy tissue and tumors, and represents a promising target to improve the differential effect of RT in the future.^{6,7} Following radiation exposure, the global endothelial cell response covers a wide range of molecular changes with a global expression pattern of modifications.^{8,9} Changes occur at the transcriptional, translational and post-translational levels and impact cell phenotype as well as the microenvironment by production and secretion of soluble factors such as reactive oxygen and nitrogen species (respectively ROS and RNS), chemokines, cytokines and growth factors. These radiation-induced dynamic modifications of molecular networks may control the endothelial cell phenotype and govern recruitment of immune cells.

Ionizing radiation induces an inflammatory response in organs¹⁰ and tumors¹¹ characterized by immune-inflammatory cell infiltration. Vascular endothelium plays an integrative role in the tissue response following stress, and controls the initiation and resolution of inflammatory responses through the regulation of chemotaxis and activation of leukocytes in the periphery.^{11,12} The development of this inflammatory response is regulated by a complex process that involves leukocyte-endothelium interactions composed of activation, rolling, adhesion and transmigration in the surrounding tissue¹³ (**Figure 1**). On the other hand, engaging the immune system for optimal anti-cancer therapy is an attractive contemporary concept.¹⁴ Promising current strategies generate an effective immune response to destroy the tumor in combination with RT.¹⁵ In this context, control of the adaptive immune response by the tumor endothelium is a crucial process.

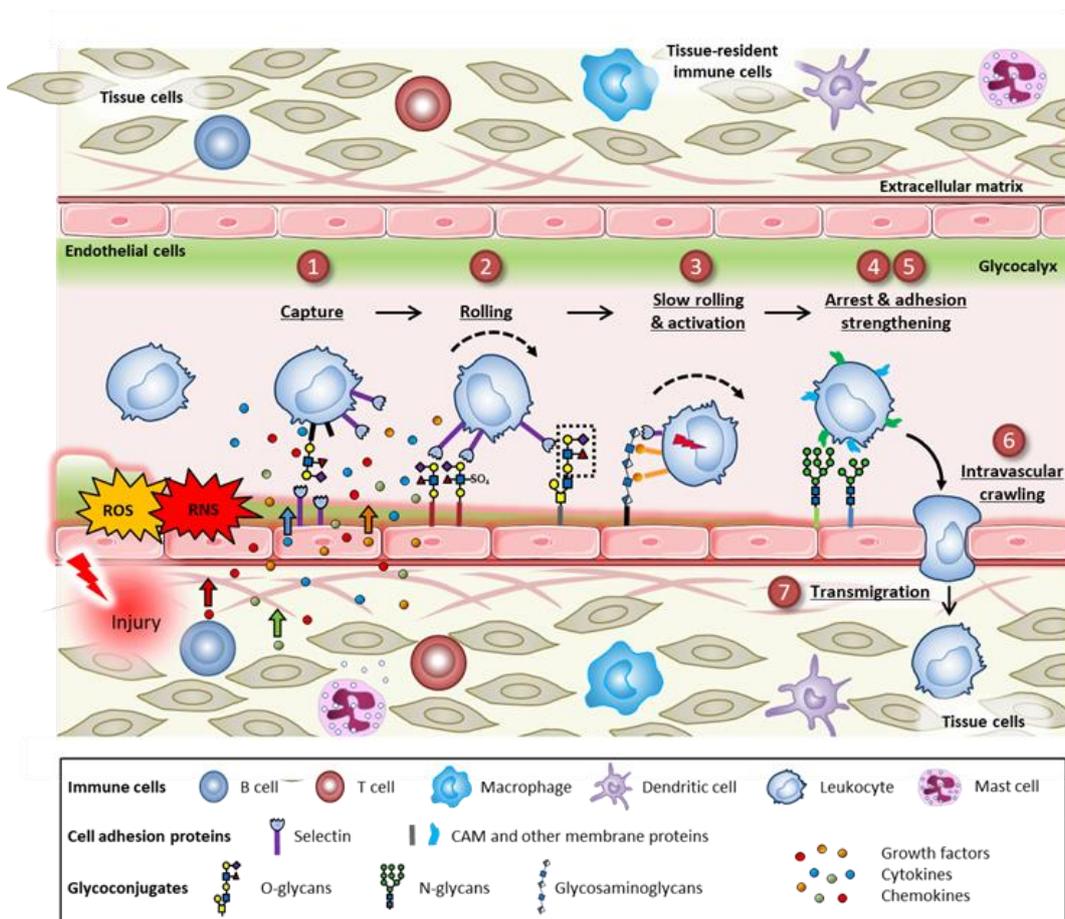


Figure 1. The leukocyte adhesion cascade is triggered by a pro-inflammatory stimulus. Injury activates endothelial cells, allows production of free radicals and damages tissue and tissue-resident immune cells leading to the release of cytokines, chemokines and growth factors, which then attract leukocytes from the circulation. Circulating leukocytes undertake a seven-step process of capture, rolling, slow rolling and activation, arrest and adhesion strengthening, intravascular crawling and finally transmigration to reach sites of inflammation. Each step of this process is controlled by various adhesion molecules at the surface of the endothelium. All of these proteins are glycosylated, a post-translational modification process that may be regulated during inflammation. During this cascade of events, leukocytes are also activated by interactions with cytokines, chemokines and growth factors sequestered by the glycosaminoglycans of the endothelial glycocalyx. RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species.

THE VASCULAR ENDOTHELIUM

A healthy endothelium is in a well-balanced state between pro- and anti-oxidants, vasodilators and vasoconstrictors, pro- and anti-inflammatory molecules, and pro- and anti-thrombotic signals. It provides key functions in angiogenic and inflammatory processes, which are activated and finely regulated when required. As can happen in case of inflammation, breakdown of this complex balance leads to a diseased or pathological endothelium displaying pro-oxidant, vasoconstrictor, pro-inflammatory and pro-thrombotic properties.

Role in immune-inflammatory cell recruitment

The endothelium is able to activate a global molecular program in physiological conditions or in response to stress and serves as a key checkpoint to control the immune response. The adhesion of leukocytes to the vascular endothelium is one of the major characteristics of inflammation. This process involves glycoproteins which allow the adhesion of circulating leukocytes in the blood stream with the endothelial cells. The objective of this adhesion is the passage of leukocytes from the bloodstream to the injured site. The endothelial cell-leukocyte interaction is the result of a large number of physical (shear forces), chemical (weak interactions and impairment of nitric oxide

(NO) production) and biological (proteins and specific glycoproteins, substrates and cytokines) factors. The cell recruitment takes place through a cascade of seven events consisting in capture (or tethering), rolling, slow rolling, arrest, adhesion strengthening and spreading, intravascular crawling, and paracellular and transcellular transmigration¹³ (**Figure 1**). The multiplicity of molecular choices for each of the stages provides a great diversity of very specific combinations of leukocyte recruitment that makes it possible to adapt recruitment to the type of tissue and injury.^{13,16}

Cell adhesion molecules (CAMs) and activation of integrins are at the heart of the adhesion process following selectin ligand recognition. Modulation of adhesion occurs through action of chemical and biological factors released by injured tissues, endothelial cells, leukocytes and innate lymphoid cells. For instance, the degranulation of activated mast cells releases histamine, leukotrienes and platelet activating factor (PAF). Histamine then activates selectins, which allows the capture of leukocytes and the initiation of rolling. Subsequently, leukotrienes and PAF participate in the activation of integrins by increasing their avidity and expression, contributing to maintain rolling and firm adhesion. On the other hand, cytokines and chemokines induce the transcription of endothelial CAMs such as selectins, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Activated endothelial cells also produce excess of ROS, which results in the activation of oxidative stress-sensitive transcription factors such as NF- κ B or AP-1. The latter also directs endothelial cells towards a pro-adhesive leukocyte phenotype.¹⁷ Conversely, NO, prostaglandin I₂ (PGI₂) and adenosine are endogenous anti-adhesive factors.¹⁷

Importance of the endothelium glycome in endothelial-immune cell interactions

Modifications of the glycan profile, whose entire spectrum defines the glycome, alter the function of proteins and participate in cellular functions, notably adhesion and cellular communication in endothelial cells. Selectins are specialized protein receptors for leukocyte glycoconjugates that mediate tethering and rolling of leukocytes under flow in inflamed vascular beds.¹⁸ Endothelial cells have many glycoconjugates on their surface that are regulated in an inflammatory context and are involved in interactions with circulating cells (**Figure 1**).¹⁹ These glycan structures can thus be considered as entry points for the immune system. In addition, the endothelial glycocalyx, a covering composed of a layer of polysaccharides covalently bound to the lipids and proteins of the membrane, also plays an important role in the immune-inflammatory response, especially via its role in leukocyte-endothelial interaction.²⁰ Following an acute or a chronic injury, pro-inflammatory stimuli such as TNF- α induce shedding of glycosaminoglycans (GAGs), thereby decreasing the width and size of the endothelial glycocalyx.²¹ This allows greater accessibility of endothelial glycoprotein epitopes, on which circulating leukocytes roll and to which they adhere.

RADIOBIOLOGY AND RADIOPATHOLOGY OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM

Ionizing radiation has multiple effects on the endothelium, which is thought to contribute to the initiation and progression of radiation-induced damage to healthy tissues.²² Among the main effects are radiation-induced cell death, loss of thromboresistance, endothelial activation and secretion of soluble factors such as cytokines and growth factors.²³ Vessels of normal tissues surrounding the tumors and of the tumors themselves are both impacted by ionizing radiation during RT. In most cases, normal and pathological tissues comprise genetically normal endothelial cells. In tumors, however, vascular cells undergo the influence of the tumor environment and display different phenotypes, and sometimes different genotypes, from those of endothelial cells from normal tissues. **Figure 2** shows a schematic view of the effects of ionizing radiation on the vascular endothelium, which are detailed below.

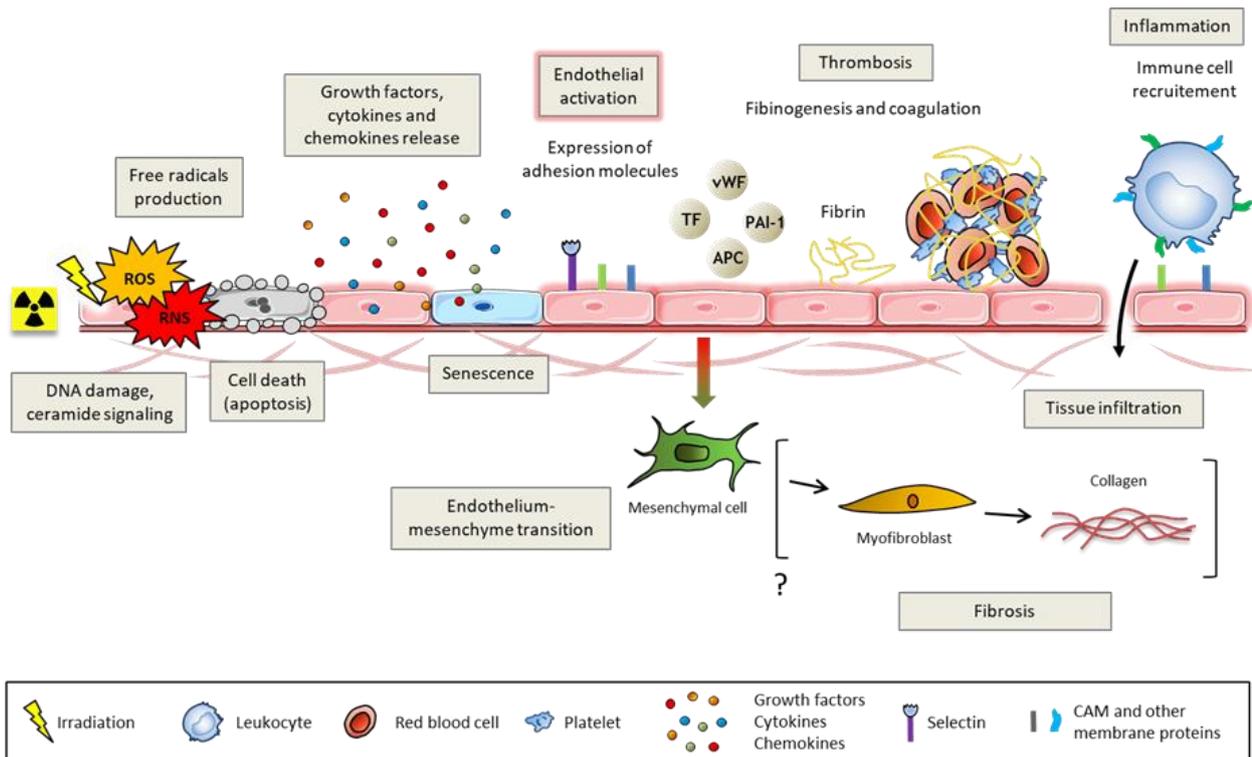


Figure 2. Ionising radiation injures the vascular endothelium. DNA damage and ceramide production lead to cell death, stress-induced premature senescence, cell activation mainly characterised by the overexpression of adhesion molecules and disruption of the endothelial barrier. Endothelial activation promotes a pro-thrombotic and pro-inflammatory phenotype that ultimately leads to thrombosis and recruitment of leukocytes. Irradiated endothelial cells can also undergo an endothelial-to-mesenchymal transition that potentially contributes to fibrosis via a final differentiation into activated myofibroblasts capable of secreting collagens. APC, antigen-presenting cells; CAM, cell adhesion molecules; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-type 1; TF, tissue factor; vWF, von Willebrand factor.

Endothelial cell apoptosis and senescence

Apoptosis is a frequent cell death process after irradiation.²⁴ Exposure of healthy tissues to a high dose of ionizing radiation (≥ 10 Gy) induces an acute endothelial reaction characterized by a rapid wave of endothelial apoptosis.^{22,25} Yet, the key role and the existence itself of radiation-induced endothelial apoptosis in normal tissue lesions remain controversial. Endothelial apoptosis has been shown to be the primary event responsible of the gastrointestinal syndrome after whole-body irradiation at 15 Gy in mice.²⁶ Despite contradictory results, which have been discussed elsewhere,²⁷ the participation of endothelial apoptosis in the deleterious tissue effects after irradiation is still widely accepted.

Endothelial cells also experience stress-induced premature senescence *in vitro* and likely *in vivo*.²⁸ Senescent irradiated endothelial cells can accumulate in tissues, promoting age- and therapy-related pathologies, including cardiovascular diseases. Through secretion of many inflammatory mediators and extracellular proteases, called the senescence-associated secretory phenotype (SASP), the senescent phenotype causes chronic inflammation and disruption of tissue structure and function. The surviving irradiated cells likely participate in the development of a dysfunctional vascular phenotype. In the early phase, it is marked by excessive secretion of pro-inflammatory cytokines, increased recruitment of circulating cells such as platelets and lymphocytes, activation of the coagulation system, and increased vascular permeability.²² In the late phase, a collapse of the vessels is observed, associated with a reduction in the thickness of the basal membrane and the persistence of a pro-coagulating, pro-inflammatory and potentially senescent endothelial phenotype.²⁹

Endothelial activation

Ionizing radiation triggers changes in the phenotype of endothelial cells that lead to endothelial activation and then potentially to endothelial dysfunction. Endothelial activation is defined as the endothelial expression of adhesion molecules, such as VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin.³⁰ It is usually triggered by pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α or interleukin (IL)-6. Loss of NO also leads to increase endothelial cell activation, which can then cause endothelial impairment, including dysfunction of the vascular tone and chronic activation of the coagulation and the immune-inflammatory systems. Radiation-induced endothelial activation results in an increased expression of adhesion proteins such as VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-selectin and P-selectin which participate in the recruitment of circulating cells.³¹⁻³⁴ Irradiation leads to increased platelet-endothelial interactions both *in vitro* and *in vivo*^{34,35} by a mechanism that involves PECAM-1. Recently, similarly to chronic inflammation induced by TNF- α or in the context of atherosclerosis,^{36,37} we showed that irradiation modifies the glycosylation pattern of endothelial cells, causing an increase in monocyte adhesion.³⁸ *In vivo*, an increase in endothelial expression of ICAM-1 and VCAM-1 has been shown in a model of intestinal inflammation induced by radiation.³⁹ Interestingly, ICAM-1 knock-out mice exhibited less severe pulmonary and intestinal inflammation than wild mice,⁴⁰ suggesting that cell infiltration could be deleterious in this context. In human patients, the endothelium can be activated by therapeutic radiation^{41,42} through activation of NF- κ B which is likely essential in the genesis of cardiovascular disease induced by RT.^{43,44} These studies have overall demonstrated that the increase in expression of adhesion molecules by endothelial cells after irradiation plays a decisive role in the recruitment of circulating cells and thus in the radiation-induced inflammation of the tissue and/or the tumor, with a potential deleterious effect on normal tissues.

Radiotherapy and vascular changes in tumors

Blood vessels are largely affected by RT depending on the number of fractions, dose rate, and total radiation dose and fraction size.⁴⁵ As a result of excessive production of angiogenic molecules, blood vessels in solid tumors display characteristic features such as dilated microvessels, incomplete endothelial lining, compression by tumor cells, excessive branching and highly irregular architecture. At a cellular level, an incomplete maturation of the capillaries is noted with absent or detached perivascular cells, absent or too thick basement membrane and lack of endothelial cells junction. This abnormal vasculature causes hypoxia that further impacts the efficacy of irradiation because lack of oxygen reduces the amount of ROS induced by irradiation and because hypoxia selects radioresistant mutant cells.⁴⁶

Observations that transplanting cancer cells into a previously irradiated site in animal resulted in a slower growth of the subsequent tumor had led to the concept of “tumor bed effect”,⁴⁷ especially following large dose of radiation (10 to 20 Gy and more). Suggestions were made that vascular damage could impact the ability to regrow after irradiation. More recently, it was demonstrated that microvascular damage, *i.e.* endothelial cell apoptosis, regulates the response of tumor cells to radiation at the clinically relevant dose range.^{48,49} However, the involvement of endothelial cells to tumor response remains controversial.⁵⁰ In SCID mice, in which *scid* mutation radiosensitized endothelial cells, the tumor growth was not affected by radiation compared with wild type mice, suggesting that vasculature did not play a significant role in tumor response to radiation in this model.⁵¹ Also, a specific deletion of *atm* in endothelial cells made them more sensitive to ionizing radiation in sarcomas⁵² but failed to enhance sarcoma eradication, unlike specific deletion of *atm* in tumor cells that increased sarcoma eradication.⁵³ These studies have strongly suggested that tumor cells, rather than endothelial cells, are critical targets for sarcoma eradication by RT delivered in high single dose, similarly to doses delivered in stereotactic body radiation therapy (SBRT), although an enhanced growth delay was observed in the tumors with the more sensitive endothelial cells.

As a consequence of endothelial sensitivity to radiation, the irradiated tumor microenvironment (TME) undergoes changes in vasculature and oxygenation rates. For large single doses over 10 Gy, microvascular density is impaired at least in a transitory manner. The decrease in vessel density corresponds to an alteration of the blood perfusion and to an increase in hypoxic zones as shown in different tumor models.⁵⁴⁻⁵⁷ Nevertheless, for repeated doses, the radiation schedule seems to matter in a more important way. A vascular density reduction is also observed but is not systematically followed by an increase in tumor hypoxia. In a clinical-relevant pattern of repeated doses from 2 to 15 Gy per fraction, the microvascular density reduction resembles vascular normalization rather than destruction. Unlike using large single doses, repeated RT leads to transitory or durable hypoxia reduction in pulmonary, prostate or head and neck cancer models.^{54,56,58}

On the other hand, fractionated RT impacts pericyte coverage of blood vessels and blood vessel functionality in the TME. Pericytes are helpful to stabilize microvessels and regulate their permeability in healthy tissues.⁵⁹ They are less frequent and more loosely associated with endothelial cells in tumors. Also, pericytes are involved in tumor hypoxia reduction⁶⁰ and cancer metastatic diffusion.⁶¹ Interestingly, pericytes are also involved in transmigration and trafficking of immune cells into tumors.⁶² Several studies show that after repeated doses from

2 to 12 Gy, pericyte coverage and blood perfusion are improved despite microvascular density reduction.^{54,56,63,64} As a consequence, immune infiltrate and immunotherapy efficacy should be enhanced.⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴³⁾⁶⁵ Tumor blood perfusion is likely multifactorial and dependent on the quality of blood supply as well as cell density and metabolism.⁶⁶ The consequences of single dose RT on pericyte coverage remain unclear and deserve to be better known. After 12 Gy, pericyte coverage and perfusion decreases in a neuroblastoma model⁵⁵ and after 20 Gy in a fibrosarcoma model,⁵⁷ whereas it increases after 12 or 14 Gy in pulmonary tumor models.^{56,67}

Radiation-induced vascular changes in normal tissues

Endothelial apoptosis, increased vascular permeability, cell activation and recruitment of inflammatory cells as well as activation of the coagulation system⁶⁸ are all early phenomena contributing to the induction and progression of radiation-induced tissue damages. Late vascular lesions, such as fibrosis and luminal reduction, also generate areas of tissue hypoxia that contribute to and amplify radiation-induced pathologic healing.⁶⁸ On the morphological level, the vascular lesions are different depending on the size of the vessels. Microvasculature is considered to be the most radiosensitive part of the vasculature. Capillary ruptures and dilatations, hypertrophy and detachment of endothelial cells from the basal lamina as well as thrombosis are observed.⁶⁸ In the case of large vessels, it is very difficult to distinguish, at the morphological level, the vascular lesions of conventional atherosclerosis from radiation-induced vascular lesions. The latter are characterized by vascular fibrosis with luminal reductions, excessive extracellular matrix deposition in the media and adventitia, neointimal hyperplasia and thrombus formations.⁶⁹ The histological similarities between radiation-induced vascular lesions and atherosclerotic lesions suggest that similar initiation and progression mechanisms could be involved.⁷⁰ At the endothelial cell surface, a thrombomodulin downregulation, observed very early after irradiation, persists chronically in both rats and humans.⁷¹⁻⁷³ The endothelium is in a chronic procoagulant state which may contribute to the long-term persistence of deleterious effects of irradiation. The induction of ICAM-1 expression in irradiated endothelial cells and an increase in neutrophil adhesion are maintained more than ten days after irradiation, suggesting a pro-inflammatory endothelial cell phenotype that persists over time.⁷⁴ *In vivo* studies also suggest that vascular damage contributes to radiation-induced fibrosis. In a pulmonary radiation-induced fibrosis model in rat, a significant hypoxia associated with severe fibrosis six months after irradiation could result from damage to endothelial cells, interstitial edema and vascular dysfunctions.⁷⁵ Recently, our group has shown that endothelial hypoxia-inducible factor-1 α deletion confers resistance to radiation-induced enteritis whereas similar deletion in intestinal epithelium does not, suggesting new functions of endothelial hypoxia-inducible factor-1 α -signaling pathways as mediators of mucosal inflammatory processes.⁷⁶ On the other hand, we demonstrated *in vivo* that the endothelium is directly involved in the progression of radiation-induced enteritis by using a mouse model harboring an endothelium-specific deletion of the *serpin 1* gene that encodes the plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1).⁷⁷

IMMUNOLOGICAL CONSEQUENCES OF RADIOTHERAPY

RT has immune-inflammatory consequences on both tumors and healthy tissues. The **Figure 3** summarizes these consequences, which are discussed below.

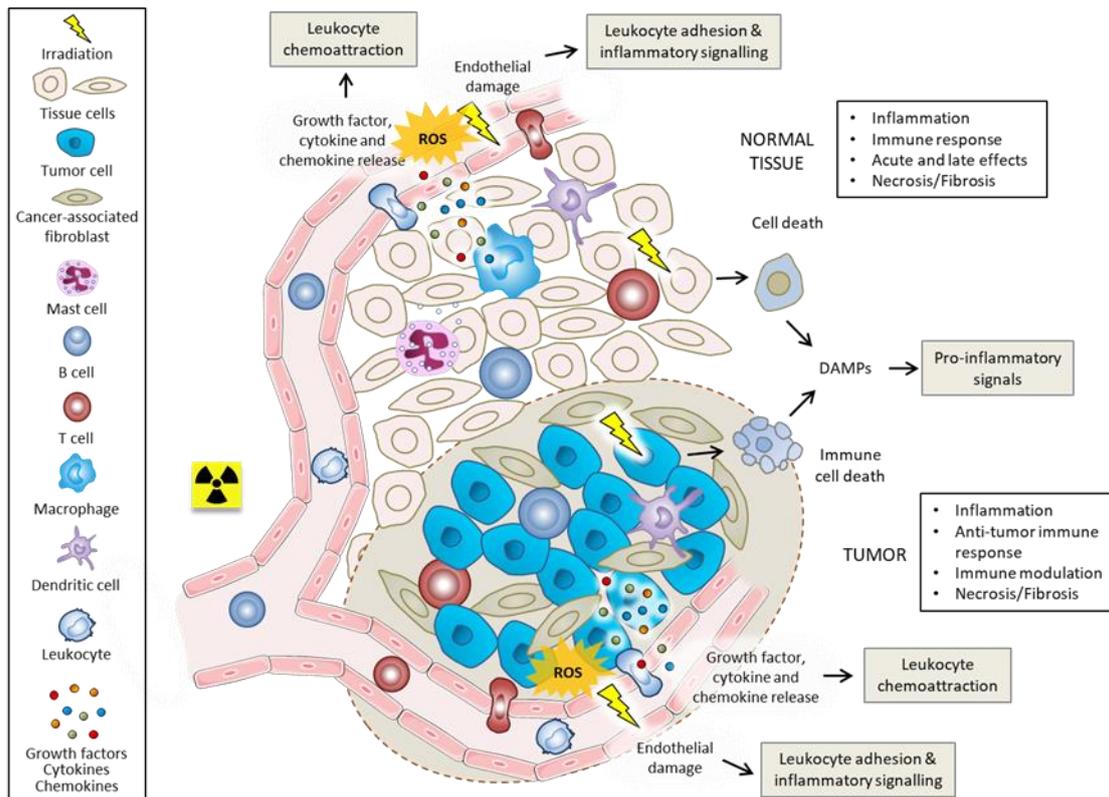
Radiation induces changes to the tumor cell immunophenotype and immunogenicity by damaging DNA and membrane, and production of cytoplasmic ROS that activate many transcription factors and signaling pathways.⁷⁸ RT promotes the presentation of tumor antigens by tumor cells by increasing the cell pool of specific antigens and by stimulating the expression of the major type 1 histocompatibility complex (MHC class 1).⁷⁹ It also generates an immunogenic cell death via the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs).^{80,81} The activated dendritic cells then present the tumor antigens to the naive T lymphocytes in the lymph nodes allowing the formation of cytotoxic T lymphocytes specific for the tumor antigen.⁸² RT facilitates the recruitment of these effector T lymphocytes by generating the secretion of the chemokine CXCL16 and endothelial expression of the cell adhesion ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin.^{74,83} These processes finally trigger an immune response which is accompanied by a pro-inflammatory reaction, with release of IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, interferon (INF)- α and IFN- γ , and TNF- α , involved in the amplification of the anti-tumor immune response.⁸¹

In normal tissues injured by radiation, release of DAMPs and secretion of cytokines and chemokines also activate the immune system. This phase moves to an acute inflammatory phase characterized by an activated pro-inflammatory response and vascular leakage. In this phase, the recruitment of diverse immune cells of myeloid

and lymphoid origin, which is associated to a perpetual cytokines/chemokines cascade,^{84,85} leads to various degrees of inflammation and symptoms. Lymphocyte subpopulations such as T_H1, T_H17, and possibly innate lymphoid cells (ILC) can contribute to inflammation while T_{reg} could be needed to control damaging and excessive pro-inflammatory responses. A too excessive response, sustained by activation, proliferation of these cells and cytokine secretion, can then shape the microenvironment of normal tissues towards the development of severe inflammation such as, for example, severe pneumonitis in the case of irradiation of the lung.⁸⁶ Mitotic cell death occurs later and can subsequently trigger tissue hypoxia leading to the release of DAMPs and cytokines/chemokines from resident cells thereby modifying the microenvironment in the tissue. These changes impact the tissue-resident immune cells that then release cytokines. Finally, epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transitions, which we have recently found to be induced by irradiation,^{87,88} mesenchymal stem cell differentiation, and the altered microenvironment contribute to myofibroblast activation and collagen deposition, which ultimately leads to fibrosis.

The recruitment of immune cells in irradiated normal tissues has a dual effect. Resolution of inflammation and repair progression is concomitant to late mitotic cell death which results from the initial damage, hypoxia and release of DAMPs, cytokines and growth factors, representing the chronic phase of radiation-induced injury of many normal tissues. These environmental changes may contribute to immunomodulation. For example, different populations of lymphocytes such as T_H2, T_H9, T_{reg} and possibly ILC display both anti-inflammatory and pro-fibrotic effects, thereby potentially promoting the induction of pathologic myofibroblasts and fibrosis.⁸⁶ It is believed that lymphocytes play a complex role in radiation diseases in which, depending on the disease stage and the environmental conditions, specific subpopulation of lymphocytes could exert beneficial or adverse effects.⁸⁶ For instance, in the case of radiation-induced pulmonary fibrosis, a disturbed balance between tissue inflammation and repair processes, with an involvement of lymphocytes, may participate in the development of the syndrome as described for other fibrotic diseases.⁸⁹ A question is whether immune cells directly contribute to radiation diseases or only modulate disease progression. In addition, it is not yet established if ILC also contribute to radiation-induced late injuries. These questions have been nicely explored in several reviews we recommend further reading in the context of radiation-induced pulmonary acute and late effects.^{86,89,90}

Figure 3. Immune-inflammatory effects of radiation exposure on normal tissues, tumours and tumour microenvironment. Ionising radiation causes tumour and normal cell damage, cell death and release of DAMPs, which act as pro-inflammatory signals. Radiation activates cells that then release cytokines/chemokines. Activated endothelial cells acquire a pro-inflammatory phenotype which promotes the leukocyte adhesion cascade. These initial responses finally lead to the recruitment and activation of diverse immune cells, which can then also participate in the abscopal effect of radiotherapy. Delayed mitotic death and proliferation of immune cells in the tissue then cause environmental changes that ultimately contribute to necrosis or fibrosis. Irradiation of the microbiota of the intestinal tract can also influence the responses of normal tissues and tumours through immune-vascular crosstalk. DAMPs, damage-associated molecular patterns; ROS, reactive oxygen species.



ENDOTHELIAL-ORIENTED STRATEGIES FOR THERAPEUTIC GAIN IN RADIATION ONCOLOGY

Endothelium-based strategies for therapeutic gain in radiation oncology attempt either to increase injuries in the tumor vascular system or to protect vasculature of normal tissue from radiation injuries, or ideally both. Many works have attempted to preserve the endothelial barrier of normal tissues by protecting endothelial cells from death, or by inhibiting vascular inflammation and endothelial cell activation. Apart from approaches that aim at radiosensitize tumors by directly targeting cancer cells, the manipulation of the TME based on the tumor vasculature and on the immune system has aroused great interest. The different endothelial-oriented strategies to improve radiotherapy are detailed below and illustrated in the **Figure 4** for normal tissues and in the **Figure 5** for tumors.

Endothelial-oriented strategies to spare normal tissue

Preventing endothelial cytotoxicity

Among effective modifiers of radiation-induced endothelial cytotoxicity *in vivo* and *in vitro*, the basic fibroblast growth factor (bFGF) has generated great interest to protect endothelial cells from apoptosis.^{26,91,92} Administration of bFGF increases the endothelial expression of thrombomodulin and is effective in reducing fibrosis, for instance within the urinary bladder.⁹³ Without going through the bFGF, a direct activation of the thrombomodulin-activated protein C (TM-APC) pathway has beneficial biological effects on the vasculature because of its anti-inflammatory, cytoprotective, antifibrinolytic, antioxidant and anticoagulant properties.⁹⁴ By using a pharmacological strategy to activate this pathway, mitigation of radiation toxicity was achieved in a relevant model of RT in which a loop of rat small bowel was exposed to nine daily doses of 5 Gy.⁹⁵ On the other hand, the targeting of CD47, a thrombospondin-1 receptor, has demonstrated that inhibiting CD47 signaling maintains the viability of normal tissues following irradiation, likely through radioprotection of endothelial cells, while increasing the radiosensitivity of tumors.⁹⁶ Also, an angiopoietin-1 mimic significantly reduces skin

radiation toxicity, potentially by increasing survival and function of irradiated endothelial cells through Tie2 receptor activation.⁹⁷ In addition, the use of a ceramide-targeting antibody to prevent ceramide platform formation in endothelial cells protects against gastrointestinal syndrome.⁹⁸ At last, a strategy that targets PAI-1 to prevent endothelial cell death has been proposed to mitigate the severity of intestinal radiation injury.⁹⁹

Decreasing coagulopathy

A radiation-induced decrease in endothelial thrombomodulin-1 leads to an increase in thrombin which results in activating blood clotting. In liver, lung and heart, the lumen of central veins becomes blocked by fibrillar material resulting in obstruction of irradiated vessels with platelet aggregates.¹⁰⁰ Therefore, there has been great interest in modulating blood coagulation as a strategy to improve normal tissue radiation toxicity. Increased platelet adherence to irradiated endothelial monolayers can be blocked by antibodies anti-von Willebrand factor.¹⁰¹ The use of anticoagulants such as heparin has been investigated but the results to date have been mostly insignificant and generally inconsistent.¹⁰² In contrast, the TM-APC pathway is a hopeful target for preventing or treating radiation toxicity in normal tissues using strategies aimed at restoring or preserving endothelial TM or replacing PC.^{95,103,104} Also, thrombin inhibition has been investigated as strategy to minimize side-effects of RT. The recombinant thrombin inhibitor hirudin has shown a protective effect against small bowel radiation toxicity in a model of localized small bowel radiation in rat.¹⁰⁵ However, the authors felt that targeting specific thrombin functions may be superior to global thrombin inhibition. On the other hand, the administration of the thrombin peptide TP508 has been shown to activate endothelial cells and stem cells to revascularize and regenerate tissues in a whole body irradiation model,^{106,107} suggesting a possible use to limit RT side effects.

Targeting premature endothelial senescence

Approaches for targeting endothelial cell senescence to prevent, mitigate and treat radiation-induced cardiovascular diseases are under investigation.²⁹ The different approaches rely on three main strategies: (i) preventing endothelial cells to become senescent using antioxidants to scavenge ROS¹⁰⁸ or inhibitors of the IGF1-PI3K-Akt/mTOR pathway that activate the radiation-induced endothelial senescence;¹⁰⁹ (ii) suppression of SASP to prevent most of the deleterious effects of senescent cells,¹¹⁰ for instance by using RNAi or JAK inhibitors to target the JAK pathway,¹¹¹ an upstream regulatory pathway of SASP; and (iii) clearing senescent endothelial cells with senolytic drugs to selectively kill senescent cells.¹¹² Clearance of senescent cells in mice by ABT263, a Bcl-2/xL-specific inhibitor, effectively cleared senescent cells in several tissues, including senescent bone marrow hematopoietic stem cells and muscle stem cells, and suppressed SASP in the lungs.¹¹³ Nevertheless, inhibiting the induction of senescence could be detrimental by increasing tumorigenesis and decreasing tumor response to RT. Moreover, since senescent cells persist *in vivo*, their elimination or death may ultimately be worse with deleterious consequences on the irradiated organ, despite their dysfunction and their key role in radiation-induced diseases, as discussed previously.¹¹⁴

Modulation of the immune-inflammatory response

A number of studies suggest that the recruitment of immune cells may become detrimental to healthy tissues when chronic and unresolved,²² and possibly participates in the initiation and/or the development of acute and late adverse tissue effects in the course of RT. Thus, strategies that target the normal tissue-associated endothelial cells would be of interest to impair their ability to recruit immune cells. In such strategy, the question of the timing of the modulation is to be explored in depth. Many studies have aimed to identify strategies to antagonize adhesion molecule function, by either preventing interactions with receptors or inhibiting NF- κ B signaling, to limit the inflammatory response. Up to now, no clinical strategy has yet emerged to control inflammation by targeting the NF- κ B-dependent endothelial adhesion molecule expression. However, mechanisms independent of the NF- κ B pathway may also regulate adhesion molecule function, including post-transcriptional regulation by IL-19¹¹⁵ and post-translational modification by N-linked sugars.³⁷ Since leukocyte trafficking in inflammation is actually governed by protein-glycans interaction,¹⁹ the understanding of these complex interactions open great hopes for the emergence of new therapeutic target to treat inflammatory diseases such as atherosclerosis, intestinal bowel diseases and thus also for radiation diseases.³⁸

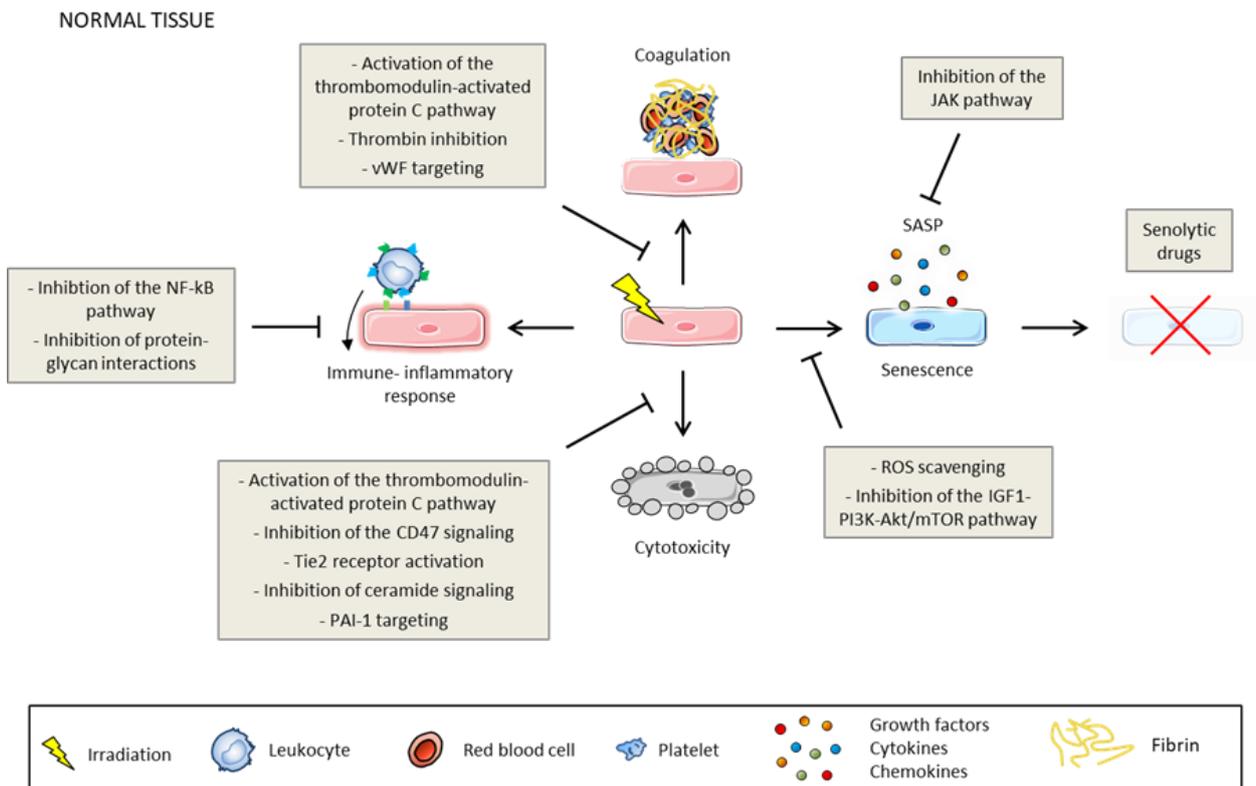


Figure 4. Potential endothelial-oriented strategies to spare normal tissue by targeting cytotoxicity, coagulation, activation of the immune-inflammatory response and senescence. PAI-1, plasminogen activator inhibitor-type 1; ROS, reactive oxygen species; SASP, senescence-associated secretory phenotype; vWF, von Willebrand factor

Endothelial-oriented strategies to target tumors

Increasing injury to tumor vasculature

The strategy to destroy the tumor vasculature has long been considered of interest to enhance the potential of RT, although a poorly vascularized tumor may then prove to be more resistant to ionizing radiation due to lower oxygen content. Using anti-VEGF antibodies (bevacizumab), anti-angiogenic therapies have shown antivascular effect in human tumors but still far from being effective in monotherapy.¹¹⁶ On the other hand, the benefit of the combination of anti-angiogenic therapy with other conventional treatments such as RT or chemo-RT has been reported in numerous studies.^{116,117} However, combined therapy was found to be associated with increased severe toxicity indicating the need to improve timing and dose delivery in the future.^{117,118} Radiation-induced damage to endothelial cells has been proposed to explain the therapeutic advantage of SBRT, but the targets that allow this enhanced therapeutic response are still the subject of debate.²⁷ In particular, the aforementioned study of Moding et al. reported cancer cells as primary targets of SBRT rather than endothelial cells.⁵³ In the same way, differences in the radiosensitivity of endothelial cells in the tumor and the normal tissues could explain the differential effect of flash-irradiation with dose rate above 100 Gy/s.^{119,120}

Cancer immunotherapy

The tumor immune response largely involves the vascular system that allows the transport of immune cells to the tumor. Radiation facilitates the trafficking, homing and extravasation of effector cytotoxic CD8⁺ T cells into the tumor, resulting in a radiation-induced immunogenic cell death.¹²¹ The complex reactions of the immune system in an irradiated TME are both immunostimulatory and immunosuppressive.⁸⁰ Immunostimulatory effects come from the recruitment of circulating immune cells due to the production of cytokines and other proinflammatory factors by the tumor and its microenvironment, antigen exposure and dendritic cell priming as well as activation of the endothelial cells present in the tumor. In contrast, tumors and their microenvironment contains rather immunosuppressive immune cells like tumor associated macrophages (TAMs) which resemble the alternatively activated M2 macrophage, and T_{Reg} cells that exerts immunosuppressive and tolerizing effects. If radiation-induced immunosuppressive effects could be overcome, and/or immunostimulatory effects enhanced,

RT would promote strong responses against tumor cells. A strategy to improve the recruitment of immune cells in tumors to enhance tumor cell death would be to manipulate the tumor-associated endothelial cells. In this way, Wilson et al. have shown that the delivery of miR-103 in tumor-bearing mice leads to decreased angiogenesis and tumor growth by radiosensitization of tumor cells.¹²² Also, a strategy that consists in increasing the ability of endothelial cells to adhere to circulating cells would also allow immune infiltration of the tumors to promote tumor cell death. However, to date, the molecular targets and the molecules to test have still to be discovered.

Opening the endothelium for drug delivery

Local tumor irradiation (≥ 15 Gy) has recently been shown to substantially improve the delivery of therapeutic nanoparticles in a preclinical study with a benefit on tumor control.¹²³ Interestingly, TAM, which can serve as nanoparticle drug depot,¹²⁴ increased in the vicinity of the microvasculature after a therapeutic priming of the TME by irradiation, which finally increased therapeutic nanoparticles delivery. In this model, radiation initiated a vascular burst of TAM extravasation through a cascade of changes to the tumor vasculature and microenvironment, leading to an increase uptake of the drug in neighboring tumor cells. Vessel thickening, tortuous vascular branching and perivascular TAM localization were induced by radiation, all contributing to enhance vessel permeability, allowing selective therapeutic nanoparticles delivery through TAM and improving tumor killing. These findings show that TAM were beneficial for drug delivery and, since RT stimulates an increase in TAM relative to the tumor,^{123,125,126} open new interesting perspectives for combined RT and therapeutic nanoparticles treatment with broad applicability.

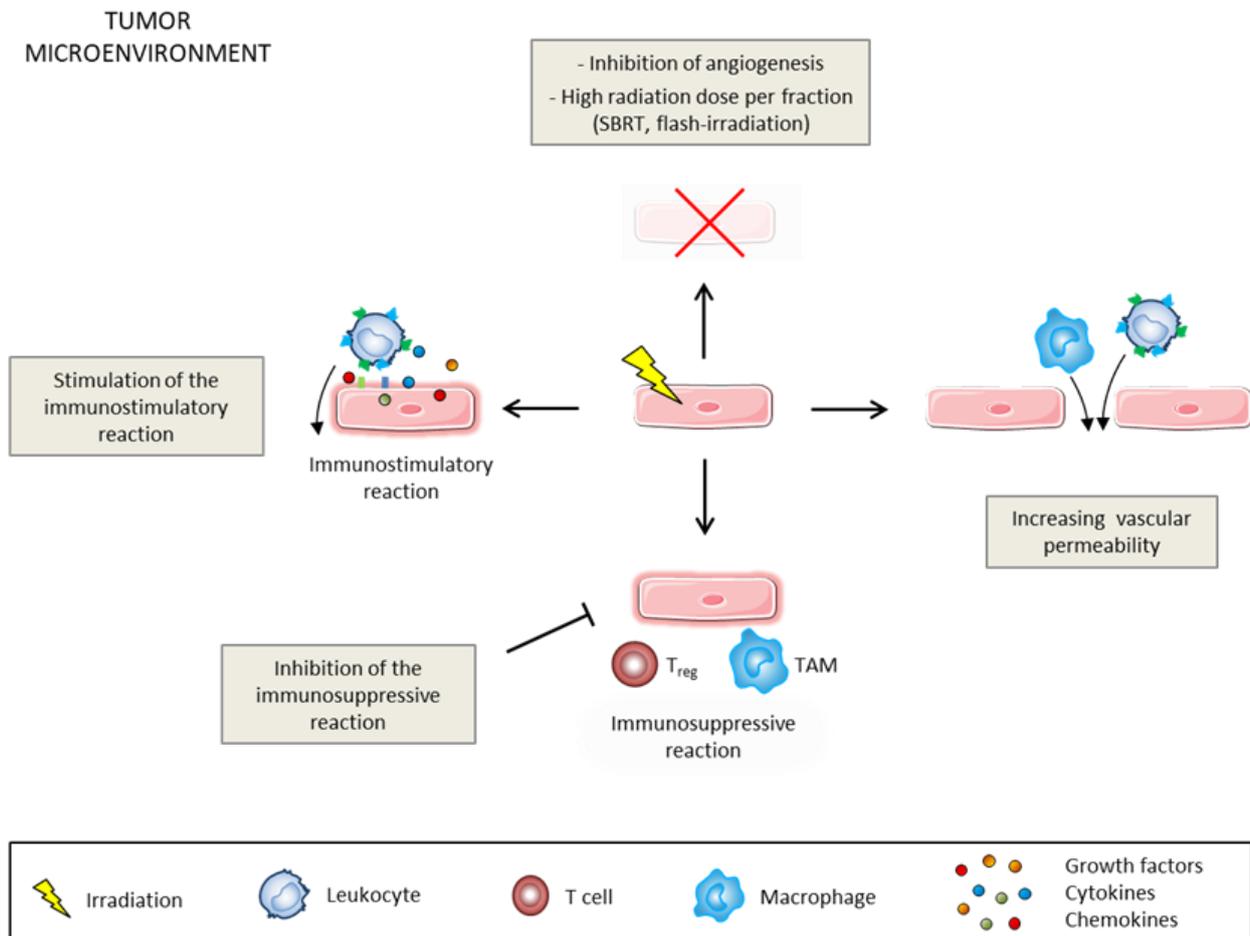


Figure 5. Endothelial-oriented strategies to enhance tumour control by targeting the immunostimulatory and immunosuppressive reactions, inducing cell death and increasing vascular permeability to allow immune cell infiltration. SBRT, stereotactic body radiation therapy, TAM, tumour-associated macrophage.

CONCLUSIONS

In light of the current knowledge, the vascular endothelium can be considered as a principal checkpoint for radiation-induced inflammatory and immunity processes following radiation exposure in both normal tissues and tumors. The endothelium could therefore be an ideal target compartment for improving the therapeutic index of RT. Future studies should focus on endothelial molecular targets of both normal tissues and tumors, but with opposite objectives. In normal tissues, therapeutic strategies will aim at modulate immune-inflammatory cell entry, at periods of time which will have to be precisely determined for each treatment. In the tumors, treatments associated with radiotherapy and other treatments will aim at opening the endothelium barrier to enhance the immune response.

REFERENCES

1. Shrieve DC, Loeffler JS. Human radiation injury. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
2. Stone HB, McBride WH, Coleman CN. Modifying normal tissue damage postirradiation. Report of a workshop sponsored by the Radiation Research Program, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, September 6-8, 2000. *Radiat Res* 2002; 157: 204–23.
3. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
4. Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 526–42. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd4003>
5. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 239–53. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3007>
6. Liauw SL, Connell PP, Weichselbaum RR. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci Transl Med* 2013; 5: 173sr2. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005148>
7. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 505–14. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc2868>
8. Azimzadeh O, Sievert W, Sarioglu H, Merl-Pham J, Yentrapalli R, Bakshi MV, et al. Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of long-term radiation-induced vascular dysfunction. *J Proteome Res* 2015; 14: 1203–19. doi: <https://doi.org/10.1021/pr501141b>
9. Heinonen M, Guipaud O, Milliat F, Buard V, Micheau B, Tarlet G, et al. Detecting time periods of differential gene expression using Gaussian processes: an application to endothelial cells exposed to radiotherapy dose fraction. *Bioinformatics* 2015; 31: 728–35. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu699>
10. François A, Milliat F, Guipaud O, Benderitter M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 1–9. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/123241>
11. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013; 14: 1014–22. doi: <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
12. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of nonlymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 232–46. doi: <https://doi.org/10.1038/nri3641>
13. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678–89. doi: <https://doi.org/10.1038/nri2156>
14. Mauge L, Terme M, Tartour E, Helley D. Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. *Front Oncol* 2014; 4: 61. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00061>
15. Zitvogel L, Kroemer G. Subversion of anticancer immunosurveillance by radiotherapy. *Nat Immunol* 2015;
- 16: 1005–7. doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3236>
16. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014; 41: 694–707. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
17. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the microcirculation: Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
18. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 2011; 118: 6743–51. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-343566>
19. Scott DW, Patel RP. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* 2013; 23: 622–33. doi: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt014>
20. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1282–H1291. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00117.2002>
21. Henry CBS, Duling BR. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2815–H2823. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.6.H2815>
22. Korpela E, Liu SK. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat Oncol* 2014; 9: 266. doi: <https://doi.org/10.1186/s13014-014-0266-7>
23. Milliat F, François A, Tamarat R, Benderitter M. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angeiol* 2008; 57: 139–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2008.02.015>
24. Baselet B, Azimzadeh O, Erbelinger N, Bakshi MV, Dettmering T, Janssen A, et al. Differential impact of single-dose Fe ion and X-ray irradiation on endothelial cell transcriptomic and proteomic responses. *Front Pharmacol* 2017; 8: 570. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00570>
25. Helm A, Lee R, Durante M, Ritter S. The influence of C-ions and X-rays on human umbilical vein endothelial cells. *Front Oncol* 2016; 6: 5. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00005>
26. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 2010; 31: 363–72. doi: <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>
27. Corre I, Niaudet C, Paris F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 2010; 704: 61–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrv.2010.01.014>
28. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001; 293: 293–7. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1060191>
29. Karam SD, Bhatia S. The radiobiological targets of SBRT: tumor cells or endothelial cells? *Ann Transl Med* 2015; 3: 290. doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.17>
30. Lafargue A, Degorre C, Corre I, Alves-Guerra MC, Gaugler MH, Vallette F, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic Biol Med* 2017; 108: 750–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019>

31. Wang Y, Boerma M, Zhou D. Ionizing radiation-induced endothelial cell senescence and cardiovascular diseases. *Radiat Res* 2016; 186: 153–61. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14445.1>
32. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* 2013; 123: 540–1. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI66843>
33. Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp Cell Res* 1998; 238: 148–54. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3826>
34. Quarmby S, Kumar P, Wang J, Macro JA, Hutchinson JJ, Hunter RD, et al. Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 588–97. doi: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.588>
35. Quarmby S, Hunter RD, Kumar S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 3375–81.
36. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Aigueperse J. PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2020–6. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00951.x>
37. Mouthon MA, Vereycken-Holler V, Van der Meeren A, Gaugler MH. Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy. *Radiat Res* 2003; 160: 593–9. doi: <https://doi.org/10.1667/3068>
38. Chacko BK, Scott DW, Chandler RT, Patel RP. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J Biol Chem* 2011; 286: 38738–47. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247981>
39. Scott DW, Chen J, Chacko BK, Traylor JG, Orr AW, Patel RP. Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: e51–e59. doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.253203>
40. Jailliet C, Morelle W, Slomianny MC, Paget V, Taret G, Buard V, et al. Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences. *Sci Rep* 2017; 7: 5290. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05563-y>
41. Mollà M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biète A, et al. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 264–73. doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00523-6)
42. Hallahan DE, Virudachalam S. Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6432–7. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6432>
43. Halle M, Ekström M, Farnébo F, Tornvall P. Endothelial activation with prothrombotic response in irradiated microvascular recipient veins. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63: 1910–6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.12.001>
44. Halle M, Gabrielsen A, Paulsson-Berne G, Gahm C, Agardh HE, Farnébo F, et al. Sustained inflammation due to nuclear factor-kappa B activation in irradiated human arteries. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 1227–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.10.047>
45. Halle M, Hall P, Tornvall P. Cardiovascular disease associated with radiotherapy: activation of nuclear factor kappa-B. *J Intern Med* 2011; 269: 469–77. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02353.x>
46. Halle M, Tornvall P. Beyond nuclear factor kappaB in cardiovascular disease induced by radiotherapy. *J Intern Med* 2011; 270: 486. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02439.x>
47. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 27066. doi: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
48. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 213–28. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
49. Hromada C, Mühleder S, Grillari J, Redl H, Holnthoner W. Endothelial extracellular vesicles-promises and challenges. *Front Physiol* 2017; 8: 275. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00275>
50. Xu S, Wang J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, et al. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol* 2015; 12: 1355–63. doi: <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1100795>
51. Albanese J, Dainiak N. Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp Hematol* 2003; 31: 455–64. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00050-X)
52. Jella KK, Rani S, O'Driscoll L, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM. Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiat Res* 2014; 181: 138–45. doi: <https://doi.org/10.1667/RR13337.1>
53. Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, Carter DR, Kadhim MA. Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiat Res* 2012; 177: 539–45. doi: <https://doi.org/10.1667/RR2868.1>
54. Al-Mayah A, Bright S, Chapman K, Irons S, Luo P, Carter D, et al. The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutat Res* 2015; 772: 38–45. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.007>
55. Sztowski B, Antoniuk S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, et al. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 806–12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.12.018>
56. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 27–33. doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.218123>
57. Krishnan EC, Krishnan L, Jewell B, Bhatia P, Jewell WR. Dose-dependent radiation effect on microvasculature and repair. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1321–5.
58. Park KR, Monsky WL, Lee CG, Song CH, Kim DH, Jain RK, et al. Mast cells contribute to radiation-induced vascular hyperpermeability. *Radiat Res* 2016; 185: 182–9. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14190.1>
59. Gabrys D, Greco O, Patel G, Prise KM, Kanthou C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 1553–62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.08.039>
60. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2014; 235: 510–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.932>
61. Potiron VA, Abderrahmani R, Clément-Colmou K, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Paris F, et al. Improved functionality of the vasculature during conventionally fractionated radiation therapy of prostate cancer. *PLoS One* 2013; 8: e84076. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084076>
62. Burrell K, Hill RP, Zadeh G. High-resolution in-vivo analysis of normal brain response to cranial irradiation. *PLoS One* 2012; 7: e38366. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038366>
63. Ceelen W, Smeets P, Backes W, Van Damme N, Boterberg T, Demetter P, et al. Noninvasive monitoring of radiotherapy-induced microvascular changes using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) in a colorectal tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 1188–96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.10.026>
64. Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res* 2012; 1433: 114–26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.022>
65. Li YQ, Chen P, Jain V, Reilly RM, Wong CS. Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. *Radiat Res* 2004; 161: 143–52.
66. Debbage PL, Seidl S, Kreczy A, Hutzler P, Pavelka M, Lukas P. Vascular permeability and hyperpermeability in a murine adenocarcinoma after fractionated radiotherapy: an ultrastructural tracer study. *Histochem Cell Biol* 2000; 114: 259–75.
67. Lee WH, Warrington JP, Sonntag WE, Lee YW. Irradiation alters MMP-2/TIMP-2 system and collagen type IV degradation in brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 82: 1559–66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.032>
68. van Vulpén M, Kal HB, Taphoorn MJ, El-Sharouni SY. Changes in blood/brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? (Review). *Oncol Rep* 2002; 9: 683–8. doi: <https://doi.org/10.3892/or.9.4.683>

69. Park HJ, Griffin RJ, Hui S, Levitt SH, Song CW. Radiation-induced vascular damage in tumors: implications of vascular damage in ablative hypofractionated radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiat Res* 2012; 177: 311–27. doi: <https://doi.org/10.1667/RR2773.1>
70. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 180–92. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc2344>
71. Milas L, Hunter N, Peters LJ. The tumor bed effect: dependence of tumor take, growth rate, and metastasis on the time interval between irradiation and tumor cell transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 379–83. doi: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(87\)90012-5](https://doi.org/10.1016/0360-3016(87)90012-5)
72. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; 300: 1155–9. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1082504>
73. Kolesnick R, Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 5897–906. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206702>
74. Hill RP. The changing paradigm of tumour response to irradiation. *Br J Radiol* 2017; 90: 20160474. doi: <https://doi.org/10.1259/bjr.20160474>
75. Budach W, Taghian A, Freeman J, Gioioso D, Suit HD. Impact of stromal sensitivity on radiation response of tumors. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 988–93. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/85.12.988>
76. Moding EJ, Lee CL, Castle KD, Oh P, Mao L, Zha S, et al. Atm deletion with dual recombinase technology preferentially radiosensitizes tumor endothelium. *J Clin Invest* 2014; 124: 3325–38. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI73932>
77. Moding EJ, Castle KD, Perez BA, Oh P, Min HD, Norris H, et al. Tumor cells, but not endothelial cells, mediate eradication of primary sarcomas by stereotactic body radiation therapy. *Sci Transl Med* 2015; 7: 278ra34. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4214>
78. Chen FH, Chiang CS, Wang CC, Tsai CS, Jung SM, Lee CC, et al. Radiotherapy decreases vascular density and causes hypoxia with macrophage aggregation in TRAMP-C1 prostate tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1721–9. doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1471>
79. Jani A, Shaikh F, Barton S, Willis C, Banerjee D, Mitchell J, et al. High-dose, single-fraction irradiation rapidly reduces tumor vasculature and perfusion in a xenograft model of neuroblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 94: 1173–80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.12.367>
80. Lan J, Wan XL, Deng L, Xue JX, Wang LS, Meng MB, et al. Ablative hypofractionated radiotherapy normalizes tumor vasculature in lewis lung carcinoma mice model. *Radiat Res* 2013; 179: 458–64. doi: <https://doi.org/10.1667/RR3116.1>
81. Song C, Hong BJ, Bok S, Lee CJ, Kim YE, Jeon SR, et al. Real-time tumor oxygenation changes after single high-dose radiation therapy in orthotopic and subcutaneous lung cancer in mice: clinical implication for stereotactic ablative radiation therapy schedule optimization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 95: 1022–31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.01.064>
82. Hu F, Vishwanath K, Salama JK, Erkanli A, Peterson B, Oleson JR, et al. Oxygen and perfusion kinetics in response to fractionated radiation therapy in FaDu xenografts head and neck cancer xenografts are related to treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96: 462–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.06.007>
83. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011; 21: 193–215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
84. Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y, et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell* 2012; 21: 66–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.024>
85. Kim J, de Sampaio PC, Lundy DM, Peng Q, Evans KW, Sugimoto H, et al. Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy. *JCI Insight* 2016; 1: e90733. doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90733>
86. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* 2008; 453: 410–4. doi: <https://doi.org/10.1038/nature06868>
87. Kane JL, Krueger SA, Hanna A, Raffel TR, Wilson GD, Madhambayan GJ, et al. Effect of irradiation on tumor microenvironment and bone marrow cell migration in a preclinical tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96: 170–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.04.028>
88. Huang Y, Goel S, Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2013; 73: 2943–8. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4354>
89. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449–65.
90. Wang HH, Cui YL, Zaorsky NG, Lan J, Deng L, Zeng XL, et al. Mesenchymal stem cells generate pericytes to promote tumor recurrence via vasculogenesis after stereotactic body radiation therapy. *Cancer Lett* 2016; 375: 349–59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.033>
91. Fajardo LF. The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol* 2005; 44: 13–22. doi: <https://doi.org/10.1080/02841860510007440>
92. Stewart FA, Heeneman S, Te Poele J, Kruse J, Russell NS, Gijbels M, et al. Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage. *Am J Pathol* 2006; 168: 649–58. doi: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050409>
93. Borghini A, Gianicolo EA, Picano E, Andreassi MG. Ionizing radiation and atherosclerosis: current knowledge and future challenges. *Atherosclerosis* 2013; 230: 40–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.010>
94. Richter KK, Fink LM, Hughes BM, Sung CC, Hauer-Jensen M. Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy? *Radiat Oncol* 1997; 44: 65–71. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(97\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(97)00063-7)
95. Richter KK, Fink LM, Hughes BM, Shmaysani HM, Sung CC, Hauer-Jensen M. Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am J Surg* 1998; 176: 642–7. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(98\)00280-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(98)00280-3)
96. Wang J, Zheng H, Ou X, Fink LM, Hauer-Jensen M. Deficiency of microvascular thrombomodulin and upregulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am J Pathol* 2002; 160: 2063–72. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61156-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61156-X)
97. Gaugler MH, Squiban C, van der Meer A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 1997; 72: 201–9. doi: <https://doi.org/10.1080/095530097143428>
98. Vujaskovic Z, Ansher MS, Feng QF, Rabbani ZN, Amin K, Samulski TS, et al. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 851–5. doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)01593-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(01)01593-0)
99. Toullec A, Buard V, Rannou E, Tarlet G, Guipaud O, Robine S, et al. HIF-1 α deletion in the endothelium, but not in the epithelium, protects from radiation-induced enteritis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018; 5: 15–30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.08.001>
100. Rannou E, François A, Toullec A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, et al. In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep* 2015; 5: 15738. doi: <https://doi.org/10.1038/srep15738>
101. Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, Drake CG. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol* 2015; 16: e498–e509. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00007-8)
102. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, K.Wansley E, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006; 203: 1259–71. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20052494>
103. Golden EB, Apetoh L. Radiotherapy and immunogenic cell death. *Semin Radiat Oncol* 2015; 25: 11–17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2014.07.005>
104. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 409–25. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3958>

105. Schaeue D, McBride WH. Links between innate immunity and normal tissue radiobiology. *Radiat Res* 2010; 173: 406–17. doi: <https://doi.org/10.1667/RR1931.1>
106. Demaria S, Formenti SC. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front Oncol* 2012; 2: 95. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00095>
107. Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, et al. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J Immunol* 2008; 181: 3099–107. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3099>
108. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 99–109. doi: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00095-G](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00095-G)
109. Schaeue D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* 2012; 178: 505–23. doi: <https://doi.org/10.1667/RR3031.1>
110. Wirsdörfer F, Jendrossek V. The role of lymphocytes in radiotherapy-induced adverse late effects in the lung. *Front Immunol* 2016; 7: 591. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00591>
111. Mintet E, Lavigne J, Paget V, Tarlet G, Buard V, Guipaud O, et al. Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice. *Sci Rep* 2017; 7: 4933. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05389-8>
112. Mintet E, Rannou E, Buard V, West G, Guipaud O, Tarlet G, et al. Identification of endothelial-to-mesenchymal transition as a potential participant in radiation proctitis. *Am J Pathol* 2015; 185: 2550–62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.028>
113. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5: 11. doi: <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-11>
114. Schaeue D, McBride WH. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Front Oncol* 2012; 2: 119. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00119>
115. Pober JS, Tellides G. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33: 49–57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.09.006>
116. Ganss R, Hanahan D. Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res* 1998; 58: 4673–81.
117. Uldry E, Faes S, Demartines N, Dormond O. Fine-tuning tumor endothelial cells to selectively kill cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1401. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18071401>
118. Hendry SA, Farnsworth RH, Solomon B, Achen MG, Stacker SA, Fox SB. The role of the tumor vasculature in the host immune response: implications for therapeutic strategies targeting the tumor microenvironment. *Front Immunol* 2016; 7: 621. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00621>
119. Griffioen AW, Damen CA, Blijham GH, Groenewegen G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood* 1996; 88: 667–73.
120. Dirx AE, Oude Egbrink MG, Kuijpers MJ, van der Niet ST, Heijnen VV, Bouma-ter Steege JC, et al. Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res* 2003; 63: 2322–9.
121. Griffioen AW, Damen CA, Martinotti S, Blijham GH, Groenewegen G. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. *Cancer Res* 1996; 56: 1111–7.
122. Lanitis E, Irving M, Coukos G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr Opin Immunol* 2015; 33: 55–63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.011>
123. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 65–85. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21358>
124. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 2004; 6: 553–63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.10.011>
125. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Lowdose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell* 2013; 24: 589–602. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.014>
126. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 2009; 10: 718–26. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70082-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70082-8)
127. Ma Y, Kepp O, Ghiringhelli F, Apetoh L, Aymeric L, Locher C, et al. Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin Immunol* 2010; 22: 113–24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.03.001>
128. Wennerberg E, Lhuillier C, Vanpouille-Box C, Pilonis KA, García-Martínez E, Rudqvist NP, et al. Barriers to radiation-induced in situ tumor vaccination. *Front Immunol* 2017; 8: 229. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00229>
129. Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev* 2015; 41: 503–10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.03.011>
130. Sceneay J, Chow MT, Chen A, Halse HM, Wong CS, Andrews DM, et al. Primary tumor hypoxia recruits CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res* 2012; 72: 3906–11. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3873>
131. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010; 207: 2439–53. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20100587>
132. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirse J, Morias Y, et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* 2014; 74: 24–30. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1196>
133. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 α suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 2010; 70: 7465–75. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1439>
134. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011; 475: 226–30. doi: <https://doi.org/10.1038/nature10169>
135. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDC-mediated T cell activation. *J Exp Med* 2014; 211: 781–90. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20131916>
136. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hämmerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002; 62: 1462–70.
137. Kinlay S, Michel T, Leopold JA. The future of vascular biology and medicine. *Circulation* 2016; 133: 2603–9. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023513>
138. Ferreira MR, Muls A, Deamaley DP, Andreyev HJ. Microbiota and radiation-induced bowel toxicity: lessons from inflammatory bowel disease for the radiation oncologist. *Lancet Oncol* 2014; 15: e139–e147. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70504-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70504-7)
139. Gerassy-Vainberg S, Blatt A, Danin-Poleg Y, Gershovich K, Sabo E, Nevelsky A, et al. Radiation induces proinflammatory dysbiosis: transmission of inflammatory susceptibility by host cytokine induction. *Gut* 2018; 67: 97–107. doi: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313789>
140. Cui M, Xiao H, Li Y, Zhou L, Zhao S, Luo D, et al. Faecal microbiota transplantation protects against radiation-induced toxicity. *EMBO Mol Med* 2017; 9: 448–61. doi: <https://doi.org/10.15252/emmm.201606932>

141. Packey CD, Ciorba MA. Microbial influences on the small intestinal response to radiation injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 88–94. doi: <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283361927>
142. Roy S, Trinchieri G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 271–85. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.13>
143. Chen Y, Zhao Y, Cheng Q, Wu D, Liu H. The role of intestinal microbiota in acute graft-versus-host disease. *J Immunol Res* 2015; 2015: 145859–. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/145859>
144. Ratikan JA, Micewicz ED, Xie MW, Schae D. Radiation takes its Toll. *Cancer Lett* 2015; 368: 238–45. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.031>
145. Crawford PA, Gordon JI. Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13254–9. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0504830102>
146. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018; 359: 104–8. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aao3290>
147. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpnits TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018; 359: 97–103. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>
148. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018; 359: 91–7. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>
149. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 2013; 342: 967–70. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1240527>
150. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 2013; 342: 971–6. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1240537>
151. Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, Kroemer G. Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell* 2016; 165: 276–87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.001>
152. Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, Ehleiter D, Michaeli J, Vlodavsky I, et al. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 2591–7.
153. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLoughlin M, Ehleiter D, Schwartz JL, et al. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994; 54: 2582–90.
154. Zhang S, Qiu X, Zhang Y, Fu K, Zhao X, Wu J, et al. Basic fibroblast growth factor ameliorates endothelial dysfunction in radiation-induced bladder injury. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 967680–. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/967680>
155. Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate god of the vasculature in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost* 2011; 9(Suppl 1): 168–73. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04319.x>
156. Pathak R, Wang J, Garg S, Aykin-Burns N, Petersen KU, Hauer-Jensen M. Recombinant thrombomodulin (solulin) ameliorates early intestinal radiation toxicity in a preclinical rat model. *Radiat Res* 2016; 186: 112–20. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14408.1>
157. Maxhimer JB, Soto-Pantoja DR, Ridnour LA, Shih HB, Degraff WG, Tsokos M, et al. Radioprotection in normal tissue and delayed tumor growth by blockade of CD47 signaling. *Sci Transl Med* 2009; 1: 3ra7. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000139>
158. Korpela E, Yohan D, Chin LC, Kim A, Huang X, Sade S, et al. Vasculotide, an Angiotensin-1 mimetic, reduces acute skin ionizing radiation damage in a preclinical mouse model. *BMC Cancer* 2014; 14: 614. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-614>
159. Rotolo J, Stancevic B, Zhang J, Hua G, Fuller J, Yin X, et al. Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 1786–90. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI59920>
160. Abderrahmani R, François A, Buard V, Benderitter M, Sabourin JC, Crandall DL, et al. Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 942–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.01.077>
161. Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH. Endothelial-oriented strategies to spare normal tissues. In: Rubin D. B, ed. *The radiation biology of the vascular endothelium*: CRC Press; 1997. pp. 185–208.
162. Verheij M, Dewit LG, Boomgaard MN, Brinkman HJ, van Mourik JA. Ionizing radiation enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of human endothelial cells by an increase in the release of von Willebrand factor. *Radiat Res* 1994; 137: 202–7. doi: <https://doi.org/10.2307/3578813>
163. Hauer-Jensen M, Fink LM, Wang J. Radiation injury and the protein C pathway. *Crit Care Med* 2004; 32(5 Suppl): S325–S330. doi: <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000126358.15697.75>
164. Geiger H, Pawar SA, Kerschen EJ, Nattamai KJ, Hernandez I, Liang HP, et al. Pharmacological targeting of the thrombomodulin-activated protein C pathway mitigates radiation toxicity. *Nat Med* 2012; 18: 1123–9. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.2813>
165. Kennedy AR, Maity A, Sanzani JK. A review of radiation-induced coagulopathy and new findings to support potential prevention strategies and treatments. *Radiat Res* 2016; 186: 121–40. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14406.1>
166. Wang J, Zheng H, Ou X, Albertson CM, Fink LM, Herbert JM, et al. Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2027–35. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00960.x>
167. Kantara C, Moya SM, Houchen CW, Umar S, Ullrich RL, Singh P, et al. Novel regenerative peptide TP508 mitigates radiation-induced gastrointestinal damage by activating stem cells and preserving crypt integrity. *Lab Invest* 2015; 95: 1222–33. doi: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.103>
168. Olszewska-Pazdrak B, McVicar SD, Rayavara K, Moya SM, Kantara C, Gammarano C, et al. Nuclear countermeasure activity of TP508 linked to restoration of endothelial function and acceleration of DNA repair. *Radiat Res* 2016; 186: 162–74. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14409.1>
169. Dong X, Tong F, Qian C, Zhang R, Dong J, Wu G, et al. NEMO modulates radiation-induced endothelial senescence of human umbilical veins through NF- κ B signal pathway. *Radiat Res* 2015; 183: 82–93. doi: <https://doi.org/10.1667/RR13682.1>
170. Panganiban RA, Day RM. Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PLoS One* 2013; 8: e78589. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078589>
171. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013; 123: 966–72. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI64098>
172. Xu M, Tchkonja T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E6301–E6310. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>
173. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011; 479: 232–6. doi: <https://doi.org/10.1038/nature10600>
174. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 2016; 22: 78–83. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
175. Day RM, Snow AL, Panganiban RA. Radiation-induced accelerated senescence: a fate worse than death? *Cell Cycle* 2014; 13: 2011–2. doi: <https://doi.org/10.4161/cc.29457>
176. England RN, Preston KJ, Scalia R, Autieri MV. Interleukin-19 decreases leukocyte-endothelial cell interactions by reduction in endothelial cell adhesion molecule mRNA stability. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 305: C255–C265. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2013>
177. Hamming LC, Slotman BJ, Verheul HMW, Thijssen VL. The clinical application of angiostatic therapy in combination with radiotherapy: past, present, future. *Angiogenesis* 2017; 20: 217–32. doi: <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9546-9>

178. Kleibeuker EA, Griffioen AW, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL. Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword. *Drug Resist Updat* 2012; 15: 173–82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.04.002>
179. Kleibeuker EA, Ten Hooven MA, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL. Combining radiotherapy with sunitinib: lessons (to be) learned. *Angiogenesis* 2015; 18: 385–95. doi: <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9476-3>
180. Favaudon V, Caplier L, Monceau V, Pouzoulet F, Sayarath M, Fouillade C, et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci Transl Med* 2014; 6: 245ra93. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008973>
181. Montay-Gruel P, Petersson K, Jaccard M, Boivin G, Germond JF, Petit B, et al. Irradiation in a flash: unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100Gy/s. *Radiother Oncol* 2017; 124: 365–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.05.003>
182. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 51–72. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
183. Wilson R, Espinosa-Diez C, Kanner N, Chatterjee N, Ruhl R, Hipfinger C, et al. MicroRNA regulation of endothelial TREX1 reprograms the tumour microenvironment. *Nat Commun* 2016; 7: 13597. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms13597>
184. Kamrava M, Bernstein MB, Camphausen K, Hodge JW. Combining radiation, immunotherapy, and antiangiogenesis agents in the management of cancer: the Three Musketeers or just another quixotic combination? *Mol Biosyst* 2009; 5: 1262–70. doi: <https://doi.org/10.1039/b911313b>
185. Garber K. Promising early results for immunotherapy-antiangiogenesis combination. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju392. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/dju392>
186. McDermott D, Lebbé C, Hodi FS, Maio M, Weber JS, Wolchok JD, et al. Durable benefit and the potential for long-term survival with immunotherapy in advanced melanoma. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 1056–64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.06.012>
187. Miller MA, Chandra R, Cuccarese MF, Pfirschke C, Engblom C, Stapleton S, et al. Radiation therapy primes tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaal0225. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal0225>
188. Miller MA, Zheng YR, Gadde S, Pfirschke C, Zope H, Engblom C, et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nanotherapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat Commun* 2015; 6: 8692. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms9692>
189. Shiao SL, Ruffell B, DeNardo DG, Faddegon BA, Park CC, Coussens LM. TH2-polarized CD4+ T cells and macrophages limit efficacy of radiotherapy. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 518–25. doi: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0232>
190. Appelboom G, Detappe A, LoPresti M, Kunjachan S, Mitrasinovic S, Goldman S, et al. Stereotactic modulation of blood-brain barrier permeability to enhance drug delivery. *Neuro Oncol* 2016; 18: 1601–9. doi: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov137>
191. Kunjachan S, Detappe A, Kumar R, Ireland T, Cameron L, Biancur DE, et al. Nanoparticle-mediated tumor vascular disruption: a novel strategy in radiation therapy. *Nano Lett* 2015; 15: 7488–96. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b03073>

4. MODULATION DE L'HYPOXIE PAR L'IRRADIATION : COMPOSANTES EXTRAVASCULAIRES

4.1. LEVEE DU STRESS PHYSIQUE

Les zones tumorales soumises à un stress solide intense favorisent l'arrêt du cycle cellulaire au profit d'une résistance à l'apoptose majorée. Les signaux de stress induits par la compression, déplacés par le gradient de pression interstitielle, vont propager une ambiance inflammatoire au sein des zones plus lâches, ce qui soutient la prolifération des cellules plus « libres » de se diviser (21). La radiothérapie, plus efficace sur les cellules en cycle, induit une décompression progressive des zones de tension et relance la croissance cellulaire. Cet effet de décompression est ambivalent : la vague de mort cellulaire radio-induite permet une levée d'hypoxie (105), et une relance du cycle cellulaire qui permettent d'augmenter la radiosensibilité tumorale. Mais la décompression en elle-même accélère la reprise de croissance par simple effet de levée d'inhibition de contact. La prolifération soutenue, en plus de contribuer à la recroissance de la tumeur, favorise le développement de nouvelles zones d'hypoxie (106).

L'impact de la mort radio-induite des cellules tumorales sur la levée de stress physique et la consommation d'oxygène doit toutefois être nuancé. Dans les tumeurs solides, le mode préférentiel de mort cellulaire induite par l'irradiation n'est pas l'apoptose. Dans les lignées de cancer de prostate PC3 et DU145, le taux maximal d'apoptose ayant été détecté après une monodose de 10 Gy est de 3%, bien en dessous de la baisse de la survie clonogénique observée à cette dose. Dans ces lignées, l'altération ou le rétablissement de p53 n'avait d'impact ni sur la survie clonogénique, ni sur le taux d'apoptose observé dans les heures et jours suivant l'irradiation (107). La réduction du volume tumoral, retardée par rapport à l'initiation de l'irradiation, est cohérente avec l'idée d'une mort cellulaire retardée de type mort mitotique ou nécrose, liée à un blocage du cycle du fait d'une réparation des lésions impossible ou déficiente.

4.2. MODIFICATION DU METABOLISME CELLULAIRE

Cellules tumorales

Outre leur prolifération soutenue, les cellules tumorales au métabolisme altéré ont une consommation excessive de l'oxygène à disposition, aggravant l'hypoxie liée aux altérations vasculaires. L'impact de la radiothérapie, et a fortiori de la radiothérapie fractionnée, sur le métabolisme des cellules tumorales, a été peu décrit. Martinez-Outschoorn et al. ont montré que les cellules tumorales pouvaient « profiter » du stress oxydatif radio-induit dans les cellules saines du stroma tumoral. En effet, un stress oxydant excessif peut induire au sein des fibroblastes associés au cancer une autophagie mitochondriale ou mitophagie, aboutissant à la production de nutriments riches en énergie telles que les lactates ou les cétones. L'exploitation de ces ressources favorise la restauration de la phosphorylation oxydative dans les cellules tumorales, normalisant leur métabolisme en faveur d'un processus plus efficace et moins consommateur d'oxygène (108). De surcroît, l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien peut réduire le relargage de cytokines inflammatoires, ce qui peut orienter un changement de métabolisme en faveur de la phosphorylation oxydative (64). Cet effet n'a pas

été montré dans un contexte de réduction radio-induite de l'inflammation tumorale, mais l'idée d'un tel phénomène au cours d'une radiothérapie multifractionnée, est concevable.

Cellules endothéliales

Le métabolisme des cellules endothéliales tumorales est altéré, principalement par l'hypoxie. L'expression élevée de HIF1 α en condition hypoxique active également la glycolyse aérobie dans les cellules endothéliales (109). L'excès de glycolyse est associé à une altération des jonctions inter endothéliales et à un détachement des péricytes par baisse de l'expression de VE-Cadhérine. La suractivation de la voie NF κ B via HIF1 α augmente l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium et la diffusion métastatique. La réoxygénation des vaisseaux eux-mêmes induite par la radiothérapie et la réduction du stress solide permet de réduire le niveau d'expression de HIF1 α dans les cellules endothéliales et de réguler leur métabolisme en limitant les conséquences sur les jonctions inter endothéliales, l'activation péricytaire et les voies de migration, restaurant la stabilité vasculaire et la perfusion (36).

OBJECTIFS

Nous avons décrit en quoi le microenvironnement vasculaire tumoral conditionnait la réponse aux traitements antitumoraux par l'intermédiaire de la qualité du réseau vasculaire et de l'hypoxie. Réciproquement, la radiothérapie influence le microenvironnement vasculaire tumoral, par des effets pouvant aller de la normalisation des vaisseaux avec réduction de l'hypoxie à une destruction de l'endothélium avec aggravation de l'hypoxie, sans que l'on puisse les prédire avec certitude. La littérature montre que la dose administrée, le fractionnement et le type tumoral influencent les modifications vasculaires induites par l'irradiation.

S'il est quasi unanimement décrit que la radiothérapie normofractionnée permet une augmentation de la couverture péricytaire (80,81) et une réduction de l'hypoxie tumorale (64,80,82,83), l'impact des schémas hypofractionnés sur le microenvironnement vasculaire est peu décrit. Deux études utilisant des fractions de 4 et 12 Gy relatent une augmentation de la couverture péricytaire (71,84) et une réduction de l'hypoxie, mais *a contrario* 4 études relatent plutôt une augmentation de l'hypoxie avec des fractions de 6 à 9,5 Gy sur des modèles variables (81,82,85,88).

La connaissance de l'impact du schéma de fractionnement sur le microenvironnement vasculaire permettrait de mieux comprendre et d'anticiper l'efficacité de la radiothérapie et d'optimiser la distribution de traitements anticancéreux.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été tout d'abord d'observer et décrire l'impact de différents schémas progressifs de fractionnement sur la couverture péricytaire, l'hypoxie et la perfusion, pour proposer éventuellement une échelle « dose-réponse » ou un seuil de dose permettant de modéliser les modifications vasculaires

Dans un second temps, l'impact du remodelage vasculaire radio-induit sur la distribution et l'efficacité d'une chimiothérapie (la doxorubicine) a été étudié.

Enfin, les différentes questions inhérentes aux résultats obtenus concernant les mécanismes du remodelage microenvironnemental, l'infiltrat immunitaire, et l'imagerie non invasive du remodelage vasculaire, et faisant l'objet de travaux en cours seront présentés.

MATERIEL ET METHODES

1. INFLUENCE DU SCHEMA DE FRACTIONNEMENT SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL

1.1. MODELES TUMORAUX

1.1.1. Choix des modèles

Afin d'éviter les biais liés à l'utilisation d'un modèle unique, deux modèles tumoraux ont été utilisés. L'induction *in vivo* de tumeurs sous-cutanées par greffe de cellules tumorales permet de reproduire un microenvironnement vasculaire représentatif des tumeurs spontanées. Parmi les différents modèles disponibles, notre choix s'est porté sur le modèle de cancer de prostate humain PC3 et le modèle de cancer murin LLC. La problématique principale était de reproduire des conditions les plus proches des cancers solides humains tant sur le plan tumoral (hétérogénéité clonale et de vitesse de croissance, dépendance aux facteurs de croissance, mutations p53) que microenvironnemental. La greffe de cellules cancéreuses humaines n'étant possible que sur des animaux immunodéprimés, mais le microenvironnement immunitaire pouvant influencer la vascularisation tumorale et la réponse thérapeutique, le choix d'utiliser un modèle humain et un modèle syngénique immunologiquement complet, s'est imposé. En sus du modèle PC3, déjà couramment utilisé dans l'équipe et à partir duquel a été démontré le remodelage vasculaire radio-induit pour un schéma normofractionné, le modèle LLC a paru un être candidat particulièrement intéressant car à l'instar du cancer de prostate, le cancer du poumon est couramment traité par radiothérapie normo et hypofractionnée et l'hypoxie tumorale y est reconnue comme un facteur pronostic (110–112). La vitesse de croissance et la radiosensibilité nettement différentes des modèles LLC et PC3 ont été mises à profit pour éprouver la robustesse des résultats et évaluer l'influence de ces 2 paramètres.

1.1.2. Lignées cellulaires et induction tumorale

Les cellules PC3-Luc (Caliper Life Sciences, Villepinte, France) étaient cultivées en milieu RPMI, en conditions standard. Les tumeurs allogéniques ont été induites 21 jours avant l'irradiation, à des souris NMRI nude mâles âgées de 6 à 8 semaines (Janvier, Saint Berthevin, France) par injection sous-cutanée de 2 millions de cellules diluées dans 50 microlitres de milieu de culture (sans addition de sérum de veau foetal).

Les cellules LLC étaient cultivées en milieu DMEM, en conditions standard. Les tumeurs syngéniques ont été induites 10 jours avant le début de l'irradiation, dans des souris C57bl/6 femelles âgées de 6 à 8 semaines, par injection sous-cutanée d'un million de cellules diluées dans 50 microlitres de milieu de culture sans additif.

1.2. CONSTRUCTION DU PLAN EXPERIMENTAL

Trois types d'expériences ont été réalisés : une expérience dite de « microenvironnement » où l'ensemble des souris était sacrifiées 14 jours après le début de l'irradiation pour étude histologique de la tumeur, une expérience dite de « survie » où chaque

souris était sacrifiée lorsque la tumeur atteignait un volume seuil, dans le but d'évaluer l'impact de l'irradiation sur le temps de pousse tumoral et enfin, une expérience dite « cinétique », où les souris étaient sacrifiées de façon répartie dans le temps après radiothérapie hypofractionnée.

Les expériences de « microenvironnement » et de « survie » ont été réalisées indépendamment deux fois pour assurer la reproductibilité des résultats. Pour chaque expérience et chaque lignée, 50 souris ont été réparties en 5 groupes de 10, quatre groupes recevant chacun un schéma de fractionnement défini et le cinquième restant non irradié (groupe contrôle). Dès l'apparition de tumeurs palpables, celles-ci étaient mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral était ensuite extrapolé à l'aide de la formule de Tomayko (113) $0.5 \times a \times b^2$, où a est la plus grande dimension et b sa perpendiculaire. Pour l'expérience dite de « survie », le volume seuil conduisant au sacrifice de la souris était de 2000 mm^3 .

Pour l'expérience dite « de cinétique », les souris étaient réparties en un groupe contrôle de 9 souris et trois groupes de 7 souris, sacrifiés séquentiellement 1, 3 et 7 jours après radiothérapie hypofractionnée.

Pour les injections intraveineuses, les animaux bénéficiaient d'une anesthésie gazeuse à l'aide d'isoflurane à 4% de concentration. Les sacrifices étaient réalisés par dislocation cervicale et les tumeurs prélevées immédiatement. En cas de signe de souffrance ou d'atteinte du volume seuil avant la fin de l'expérience, les souris étaient systématiquement euthanasiées. L'expérimentation animale a été réalisée en accord avec la directive européenne 2010/63/UE et approuvée par le Comité d'Ethique en expérimentation animale des Pays-de Loire, C2EA-06, et enregistrée sous les protocoles APAFIS 529 et 236.

1.3. TESTS DE SURVIE CLONOGENIQUE

Le taux clonogénique de base des cellules PC3 et LLC était de 50 à 60 %. Les cellules ont étéensemencées 12 heures avant l'irradiation, à 10 % de confluence. Après 2 semaines, les cellules ont été marquées avec du Crystal violet dilué à 0.5% et les colonies ont été comptées à l'aide d'ImageJ (NIH).

1.4. RADIOTHERAPIE

Modalités d'irradiation

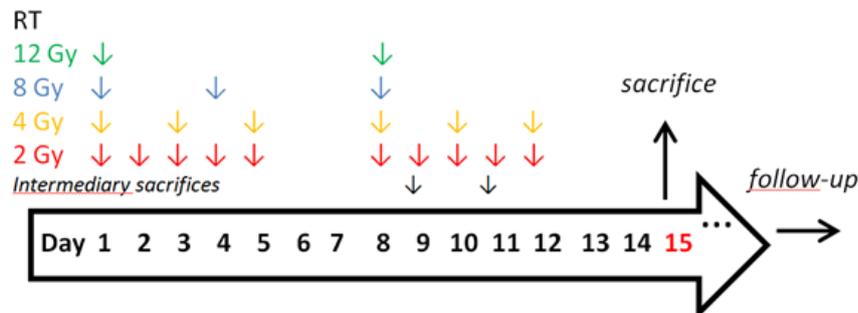
L'irradiation des souris a été réalisée à l'aide d'un irradiateur à rayons X CP-160 (Faxitron, Lincolnshire, USA) dont la tension accélératrice était de 160 kV et le débit de dose de 1.3 Gy par minute. Pendant l'irradiation, les souris étaient immobilisées à l'aide de tubes de contention adaptés manuellement, dans lesquelles une ouverture spéciale pour la patte arrière gauche avait été réalisée. La radiothérapie était centrée sur la patte arrière gauche. La tête et le corps de la souris étaient protégés par des caches en plombs adaptés.

Pour les tests de survie clonogénique, les cellules ont été irradiées à l'aide d'un irradiateur Xrad-IR-225 (Précision X-ray, North Branford, USA), dont la tension accélératrice était de 225 kV et le débit de dose de 1.78 Gy par minute.

Schémas de fractionnement /étalement

4 schémas de radiothérapie ont été choisis selon le calendrier suivant :

Figure 13 : Schémas de fractionnement utilisés



Tous les schémas ont été répartis sur 2 semaines, du lundi au vendredi (pas d'irradiation le week-end afin de reproduire les conditions cliniques).

Rouge : schéma normofractionné, 10 séances de 2 Gy

Jaune : schéma faiblement hypofractionné, 6 séances de 4 Gy, 3 séances par semaine

Bleu : schéma fortement hypofractionné, 3 séances de 8 Gy, 2 séances par semaine

Vert : schéma fortement hypofractionnée, 2 séances de 12 Gy, 1 séance par semaine

Noir : sacrifices intermédiaires pour l'étude dite « cinétique », schéma 2 x12 Gy

La contrainte majeure était d'obtenir en fin d'expérience des tumeurs sous-cutanées suffisamment volumineuses pour être collectées, sans qu'elles dépassent un volume critique pour l'animal (choisi à 2000 mm³), pour les groupes contrôle comme pour les groupes irradiés. Dans cette optique, l'étalement de l'irradiation a été fixé à 2 semaines, au bout desquelles les tumeurs ont été prélevées simultanément, au moment théorique de la séance suivante. Les doses et rythme des séances ont été inspirés de schémas cliniques utilisés dans les cancers de prostate et du poumon (114,115), de façon à ce que la dose physique totale soit similaire ou proche pour chaque schéma. Le choix de la dose physique et non de la BED calculée s'est imposé car l'utilisation de schémas à BED équivalente aurait fortement limité la gamme de doses possible. A titre d'exemple, pour le schéma PC3, la BED du schéma normofractionné sur 2 semaines est de 33.2 Gy, correspondant à une séance unique de 7 Gy ou à 4 séances de 4 Gy. Cela aurait nécessité d'exclure les doses seuil de l'apoptose endothéliale (entre 7 et 10Gy) au-delà desquelles des modifications vasculaires différentes auraient pu être observées.

1.5. HYPOXIE ET PERFUSION TUMORALES

L'hypoxie et la perfusion ont été déterminés à l'aide de marqueurs spécifiques administrés *in vivo*, dilués dans du sérum physiologique tiède.

Pour l'hypoxie, le marqueur choisi était le pimonidazole (Hypoxyprobe, Burlington, USA), agent aduit imidazolé réagissant par génération de liaisons aux groupements thiols des protéines intracellulaires en condition d'hypoxie sévère (116). Une injection intrapéritonéale de 100 µl de pimonidazole dilué à 70 mg/ml était réalisée 90 minutes avant sacrifice.

Pour la perfusion, le marqueur choisi était le Hoechst 33342 (Life technologies, Saint-Aubin, France), agent intercalant de l'ADN fluorescent, dont le très faible poids moléculaire permet une pénétration rapide dans le noyau cellulaire en cas d'apport sanguin suffisant. Une injection intraveineuse de 100 µl de Hoechst 33342 dilué à 5 mg/ml était réalisée 4 minutes avant sacrifice.

1.6. IMMUNOHISTOCHEMIE

L'information quantitative de la présence d'un ou plusieurs antigènes au sein d'un tissu peut être obtenue par différents moyens. Les immunomarquages multiples complexés sur coupe histologique, s'ils sont plus longs et laborieux à mettre au point, ont l'avantage supplémentaire d'apporter une information géographique. Pour la détection des péricytes, par exemple, la plupart des marqueurs disponibles se fixent également sur les fibres musculaires lisses. L'information spatiale et l'utilisation simultanée des marqueurs péricytaires et d'un marqueur endothélial a permis d'améliorer la spécificité de la détection des péricytes, en comptabilisant les cellules positives situées dans un périmètre restreint (2 µm) autour des vaisseaux, ce qui rend leur caractère péricytaire quasiment certain. Le marquage de l'hypoxie et de la perfusion, associé au marquage vasculaire, a permis de relever des informations supplémentaires comme la distance perfusée autour de chaque vaisseau ou la présence de vaisseaux non fonctionnels.

La densité microvasculaire, la couverture péricytaire, l'hypoxie et la perfusion tumorales ont été évaluées par immunohistochimie. Les marquages étaient réalisés sur coupes congelées, en conditions standards. Les tumeurs étaient excisées immédiatement après le sacrifice, placées en milieu OCT, refroidies progressivement par contact indirect avec l'azote liquide puis conservées à -80°C. Des sections de 5 micromètres ont été réalisées et placées sur lame. Les coupes étaient fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4%, puis perméabilisées au Triton X-100 à 0.05%. Après rinçage triple en solution saline tampon (PBS), les anticorps primaires étaient appliqués simultanément ou séquentiellement, sur un temps de pose variant de 1 à 12 heures selon les comarquages et les mises au point. Après rinçage triple, les anticorps secondaires fluorescents étaient appliqués au 200^{ème} pendant 1 heure puis rincés. Les lames étaient montées en milieu ProlongGold (Life technologies) avec DAPI, sauf pour l'analyse de la perfusion par Hoechst 33342 dont le spectre d'émission est similaire.

Les anticorps utilisés étaient les suivants :

Anticorps primaires non couplés:

- Rat anti-mouse CD31 (BD Biosciences)
- Rabbit anti-mouse desmin (Zymed)

Anticorps primaires couplés:

- Cy-3-conjugated mouse anti-αSMA (Sigma)
- FITC-conjugated anti-pimonidazole (Hypoxyprobe)

Anticorps secondaires:

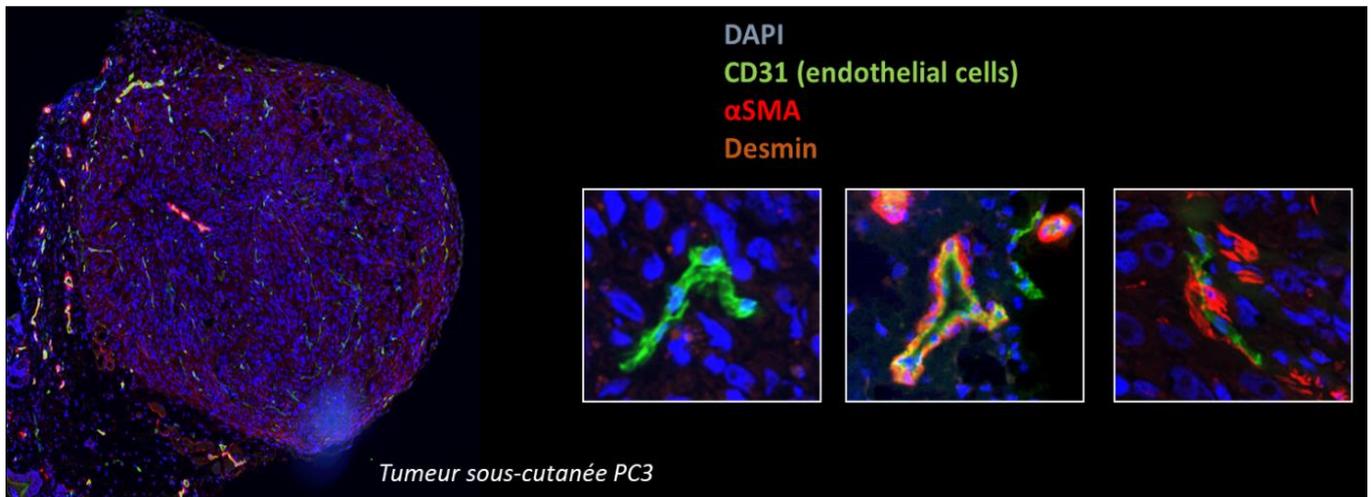
- Alexa⁶⁴⁷-conjugated goat anti-rabbit (Life technologies)
- Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-rat (Life technologies).

1.7. MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGE

Les lames ont été imagées à résolution 20X pour l'analyse de l'hypoxie et de la perfusion et 40X pour la couverture péricytaire, à l'aide d'un scanner de lames Nanozoomer HT, dans des conditions de durée d'excitation et de réception adaptées à chaque signal fluorescent, maintenues similaires pour chaque série de marquage. Chaque image tumorale était ensuite enregistrée dans des conditions de contraste et de luminosité identiques sous le format TIFF. Les analyses morphologiques et quantitatives étaient réalisées à l'aide du logiciel Fiji (NIH, USA). Selon l'intensité et la qualité des marquages correspondants, les séquences et seuils d'analyses étaient mis au point manuellement puis semi-automatisés.

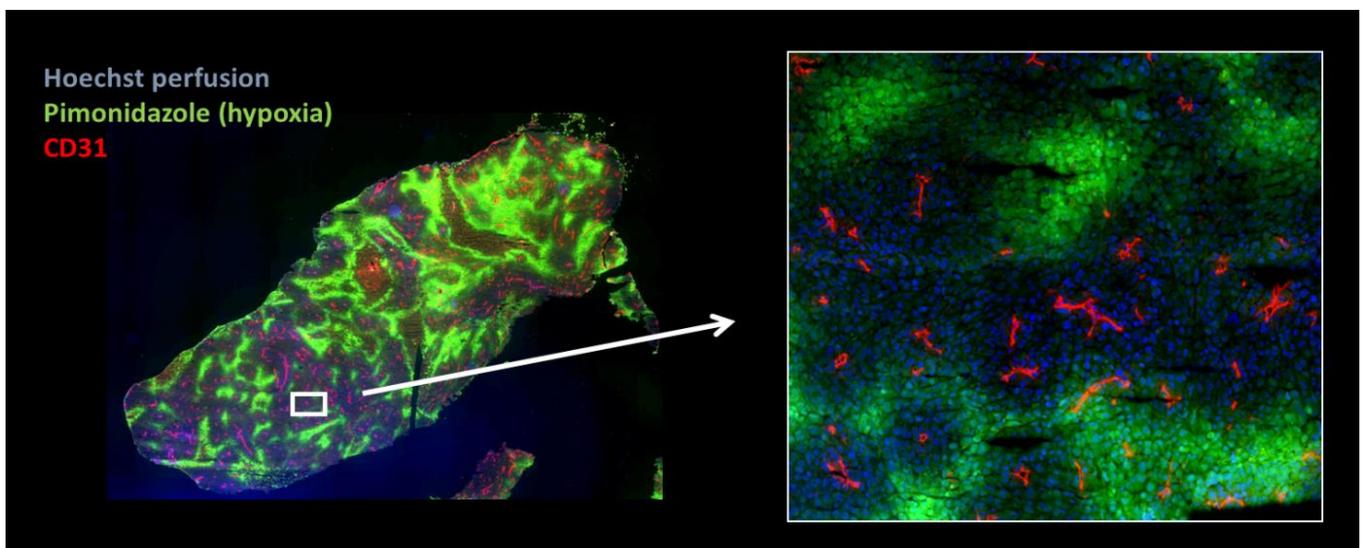
Pour le comptage de la densité microvasculaire, le signal CD31 était seuillé puis élargi de 1 μm . L'ensemble des points consécutifs compris dans l'aire ainsi définie était comptabilisé comme un microvaisseau. Pour la définition d'un index de couverture péricytaire, la surface de signal positif pour αSMA ou Desmin compris dans un rayon de 2 μm autour d'un signal CD31 était mesurée. Pour l'hypoxie et la perfusion, la surface positive pour le signal Hoechst 33342 ou pimonidazole était mesurée.

Figure 14 : Image d'une coupe de tumeur PC3 (épaisseur 5 µm) en microscopie à fluorescence



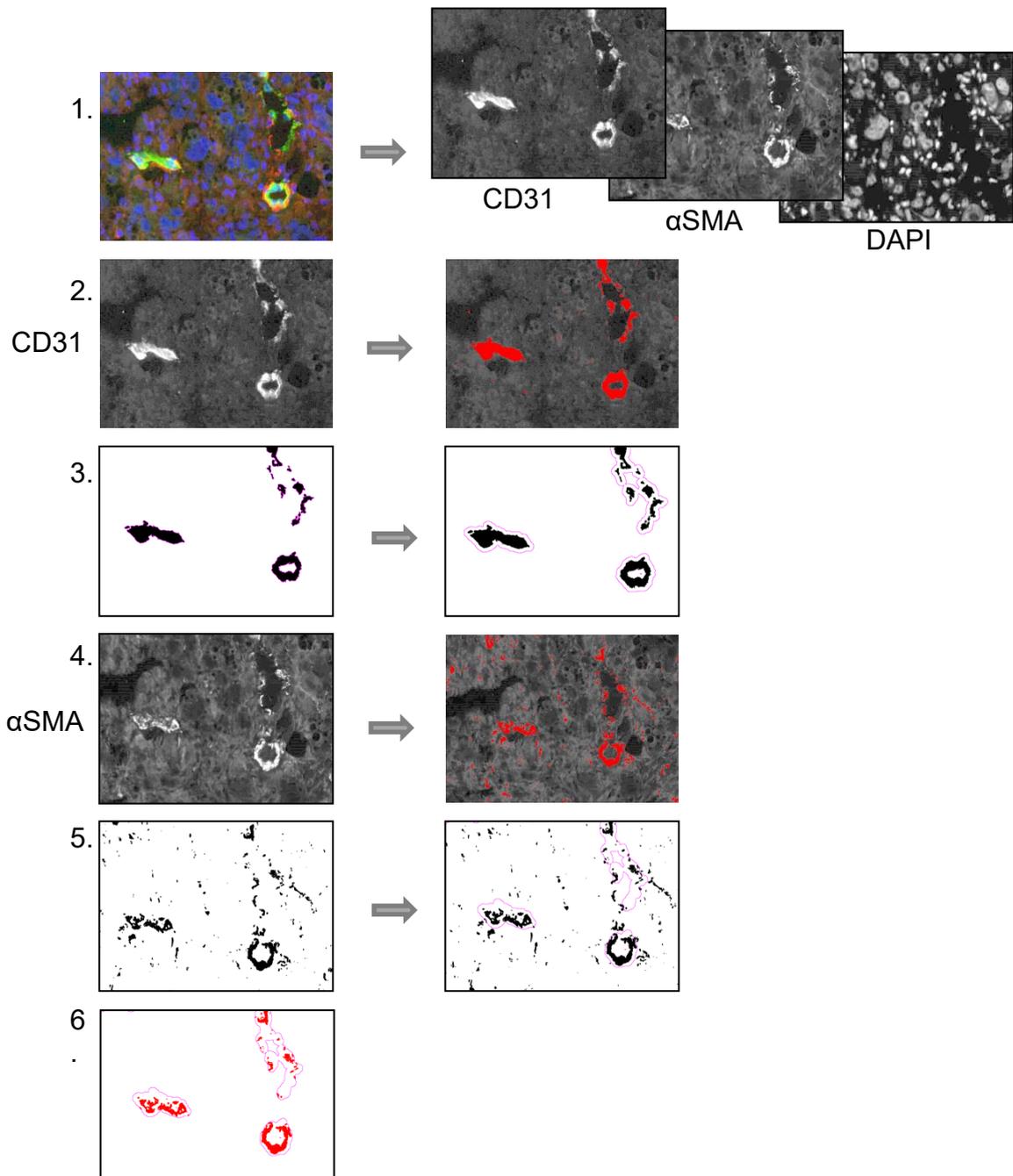
Marquage multiplexe des cellules endothéliales (CD31, vert), des péricytes (α SMA, rouge vif, desmin, rouge lointain), contre-marquage nucléaire DAPI.

Figure 15 : Image d'une coupe de tumeur LLC (épaisseur 5 µm) en microscopie à fluorescence



Marquage multiplexe des cellules endothéliales (CD31, rouge vif), de l'hypoxie sévère (pimonidazole, vert), des noyaux perfusés par le Hoechst 33342 (bleu).

Figure 16 : Méthode d'analyse d'image semi-automatisée : exemple de recueil de l'index de couverture péricytaire α SMA par mesure de la surface α SMA+ périvasculaire



1. Séparation des canaux représentant chaque longueur d'onde dans l'image
2. Sur l'image contenant le canal CD31, établissement manuel d'un seuil d'intensité et de taille permettant de délimiter les vaisseaux
3. Elargissement des contours vasculaires de 2 μ m pour obtenir une sélection comprenant le vaisseau et l'espace périvasculaire proche
4. Seuillage manuel de l'intensité du signal α SMA
5. Transposition des contours vaisseaux + espace périvasculaire sur l'image contenant le canal α SMA
6. Mesure de la surface α SMA + comprise dans l'espace périvasculaire

1.8. STATISTIQUES

Les statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, USA). La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour les analyses de survie. Les comparaisons groupées ont été réalisées à l'aide de l'analyse de variance comparée ANOVA, ou ajustées à l'aide de la comparaison des rangs par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis quand l'écart-type était significativement différent au test de Barlett. Le test de régression linéaire a été réalisé par la méthode des moindres carrés. Les différences étaient considérées comme significatives pour $p \leq 0.05$.

2. AUGMENTATION DE LA DISTRIBUTION ET DE L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE PAR LE REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT

Les matériels et méthodes étant pour la plupart identiques au paragraphe précédent, seules les dispositions particulières sont présentées dans cette partie.

2.1. MODELE LNCAP

En plus des 2 modèles PC3 et LLC décrits précédemment, un troisième modèle tumoral, induit de façon orthotopique, a été étudié. Les cellules LNCaP-luc (Caliper Life Sciences) étaient cultivées en milieu RPMI selon les conditions standard. Les tumeurs orthotopiques ont été induites dans des souris NMRI nude males de 6 à 8 semaines par injection de 5 millions de cellules dans 50 μ l de milieu sans sérum dans le lobe dorsolatéral de la prostate, par laparotomie. Les souris étaient anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine/xylazine (50/15 mg/kg). La prise de greffe et la croissance tumorale étaient suivies par bioluminescence à l'aide d'un PhotonImager (BiospaceLab, Paris). L'irradiation a débuté 6 semaines après l'injection, lorsque le signal bioluminescent atteignait une phase de croissance exponentielle. Les protocoles correspondants, validés par le Comité d'Ethique en expérimentation animale des Pays de Loire, étaient les suivants : 01262.01, APAFIS 529, APAFIS 2336.

2.2. RADIOTHERAPIE

Tout comme les tumeurs PC3 et LLC, les tumeurs LNCaP étaient irradiées à l'aide de l'irradiateur Faxitron CP-160-X-ray, à la différence que les caches plombés étaient disposés de façon à n'exposer que l'abdomen de l'animal au faisceau. Les schémas d'irradiation étaient étalés sur 2 semaines, le sacrifice étant réalisé le lundi suivant. Pour les modèles LNCaP et PC3, 10 séances de 2 Gy ont été réalisées du lundi au vendredi. Pour le modèle LLC, 2 séances hebdomadaires de 12 Gy ont été réalisées.

2.3. TRAITEMENTS

La doxorubicine est un agent intercalant de l'ADN, utilisé en routine clinique comme chimiothérapie anticancéreuse. Cette molécule a l'avantage d'émettre une fluorescence de longueur d'onde compatible avec la microscopie scientifique de routine. L'injection intraveineuse de 100 μ l d'hydrochloride de doxorubicine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier,

France) concentré à 18 mg/ml était réalisée 5 minutes avant le sacrifice, sur souris anesthésiée. Après la préparation immunohistochimique, la détection par le scanner de lame était programmée à une longueur d'onde de 594 nm. Pour l'expérience de survie, la doxorubicine était administrée en intrapéritonéal à la dose de 8mg/kg.

Le sunitinib est un agent anti-tyrosine kinases inhibiteur de VEGFR et PDGFR utilisé en association dans le traitement de certains adénocarcinomes métastatiques. Dans l'expérience indiquée, il était administré per os par gavage quotidien, dilué à 40 mg/kg dans une solution saline de pH 3.5 à laquelle 10 % de PEG 300 étaient ajoutés (117).

3. ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE IN VIVO

3.1. MODELE ET PLAN EXPERIMENTAL

L'étude de faisabilité a été réalisée au cours d'une radiothérapie normofractionnée, étalée sur 2 semaines similairement aux travaux décrits précédemment. Dix souris dans le groupe contrôle et dix souris dans le groupe irradiation normofractionnée ont été utilisées. Seul le modèle PC3 (souris Nude) a été étudié, les poils des souris C57bl/6 étant limitants pour la répartition du gel d'échographie. Le dernier jour de la dernière séance de radiothérapie, l'échographie, le scanner et le sacrifice ont été réalisés immédiatement l'un après l'autre, et les tumeurs bien individualisées afin d'obtenir une corrélation en temps réel de l'imagerie et de l'histologie.

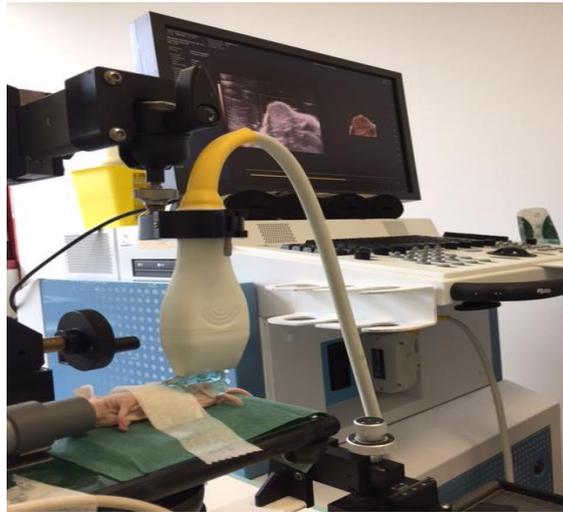
3.2. RADIOTHERAPIE

Les souris ont été irradiées à l'aide de l'irradiateur dédié aux petits animaux Xrad-IR-225 (Précision X-ray, North Branford, USA), à la tension accélératrice de 225 kV, débit de dose 1.78 Gy/minute. L'irradiation était centrée sur la tumeur à l'aide d'un collimateur cylindrique adapté à la taille tumorale. La souris était placée sur un plan horizontal et sous anesthésie gazeuse par isoflurane 4%. Le centrage était réalisé à l'aide des projections laser et images CBCT.

3.3. ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE ET PARAMETRES RECUEILLIS

L'évaluation de la perfusion par échographie de contraste a été réalisée 3 fois par semaine. L'échographe Vevo 2100 a été prêté par l'UMR930 INSERM (Université François Rabelais, Tours) et un opérateur entraîné a saisi les images et réalisé l'interprétation et les statistiques.

Figure 17 : Mesure du volume sanguin tumoral par échographie de contraste



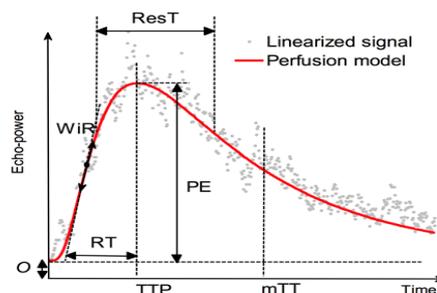
La souris anesthésiée (isoflurane) était placée sur le flanc. La sonde échographique était disposée de façon à obtenir une section de la tumeur dans sa plus grande dimension. Trente microlitres de produit de contraste échographique étaient administrés en intraveineux, la diffusion intra-tumorale des microbulles étant ainsi mesurée. Une séquence de destruction ponctuelle synchronisée des microbulles était également saisie, mesurant la diffusion immédiate du produit de contraste.

A chaque échographie étaient mesurés l'intensité de contraste maximale (Peak Enhancement ou PE), le volume sanguin brassé jusqu'à l'atteinte du pic (Wash-in AUC ou WiAUC), le flux sanguin moyen dans la tumeur (Wash-in rate ou Wir), le temps pour atteindre le pic de contraste depuis l'injection (Time to Peak TTP) ou depuis la détection de l'arrivée des microbulles dans la tumeur (Rise Time RT). Un indice de perfusion de formule $PI=WiAUC/RT$ était calculé. Les paramètres dépendants du volume tumoral étaient normalisés par rapport à la surface de l'image en 2 dimensions.

Figure 18 : Paramètres recueillis en échographie de contraste

$$f(t) = O + A \frac{1}{st\sqrt{2\pi}} e^{\left(-\frac{(\ln(t)-m)^2}{2s^2}\right)}, t > 0$$

O, A, m and s: Fitting parameters
 O: Offset; A: amplitude parameter;
 M and s: mean and SD of the normally distributed natural logarithm of t



Rise time (RT); Time to Peak (TTP); Wash-in Rate (WiR);
 Peak enhancement (PE); Wash-in Area under Curve (WiAUC); Wash-out Rate (WoR); Wash-out Area under Curve (WoAuC);
 Perfusion Index (PI = WiAUC/RT).

4. MORT CELLULAIRE PRECOCE

Pour chaque modèle, 30 souris porteuses de tumeurs sous-cutanées palpables ont été localement irradiées (comme décrit précédemment) en dose unique. Pour le modèle PC3, les tumeurs étaient induites 21 jours avant l'irradiation, et 10 jours avant pour le modèle LLC. Les souris étaient réparties, pour chaque modèle tumoral, en 6 groupes de 5 recevant respectivement les doses de 0, 2, 4, 8, 12 et 20 Gy. La souris était euthanasiée et la tumeur prélevée 4 heures après l'irradiation. Le tissu tumoral était congelé et préparé pour immunohistochimie dans les conditions déjà décrites. Un double immunomarquage CD31 et TUNEL (kit TUNEL Roche) a été réalisé. La positivité pour le marquage TUNEL était définie par l'existence d'une zone d'intensité supérieure au seuil de 2 micromètres de diamètre minimum.

5. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE

Le transcriptome des deux modèles tumoraux, avant et après irradiation fractionnée, ont été analysés et comparés. Pour chaque condition, 4 tumeurs par modèle ont été exploitées. Après préparation avec le RNeasy minikit, (Qiagen) et broyage à l'homogénéisateur fastprep24 (MPbio) (1cc de RLT contenant 10µL de beta-mercaptoéthanol 14.3 Molaire), le surnageant a été prélevé et confié à une plateforme de génomique prestataire pour analyse. Dans le modèle PC3, la tumeur étant d'origine humaine et le microenvironnement d'origine murine, le transcriptome tumoral et le transcriptome microenvironnemental ont pu être distingués. Les événements communs aux 2 lignées ont ensuite été extraits. Les heatmaps et graphiques de classification des résultats ont été obtenus à l'aide des outils libres en ligne Panther DB (www.pantherdb.org/), Gominer (<https://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>) et Cluster3 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>).

RESULTATS

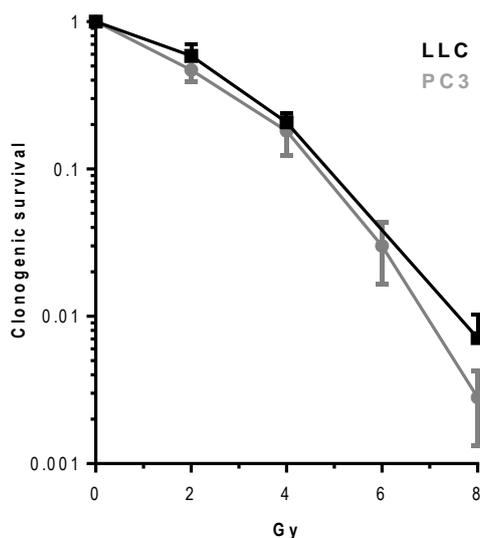
1. INFLUENCE DU SCHEMA DE FRACTIONNEMENT SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL : ETUDE DESCRIPTIVE

Les résultats qui suivent présentent l'impact de 4 différents schémas de radiothérapie, étalés sur un calendrier de 2 semaines, sur la tumeur et son microenvironnement vasculaire. Les modèles PC3 et LLC ont été étudiés et comparés.

1.1. EFFET DU FRACTIONNEMENT SUR LA CROISSANCE TUMORALE

La radiosensibilité de chaque modèle a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. Au regard des tests de clonogénicité, les cellules PC3 présentait une radiosensibilité plus élevée que les cellules LLC. Les ratios α/β ont été calculés à 2.1 pour le modèle Pc3 et 8.2 pour le modèle LLC.

Figure 19 : Radiosensibilité intrinsèque des lignées PC3 et LLC



Courbes de survie clonogénique pour les lignées PC3 (en gris) et LLC (en noir).

Pour les expériences *in vivo*, les schémas de fractionnement ont été choisis pour représenter une échelle allant du fractionnement standard à un hypofractionnement fort de 12 Gy par fraction. Le but était d'inclure un possible seuil de dose par fraction au-delà duquel la réponse vasculaire pourrait être fondamentalement différente du fait de l'apoptose massive des cellules endothéliales. Des doses physiques identiques ont été choisies sciemment, afin d'éviter les potentiels biais du modèle linéaire quadratique pour le calcul des doses biologiques. Les doses biologiques équivalentes ont tout de même été calculées et sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Doses biologiques équivalentes

Schéma RT	10 x 2 Gy	6 x 4 Gy	3 x 8 Gy	2 x 12 Gy
BED PC3 ($\alpha/\beta=2.1$)	39 Gy	69 Gy	115 Gy	161 Gy
BED LLC ($\alpha/\beta=8.2$)	25 Gy	35 Gy	47 Gy	89 Gy

BED calculée à partir du ratio α/β et de la formule

$$(S) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

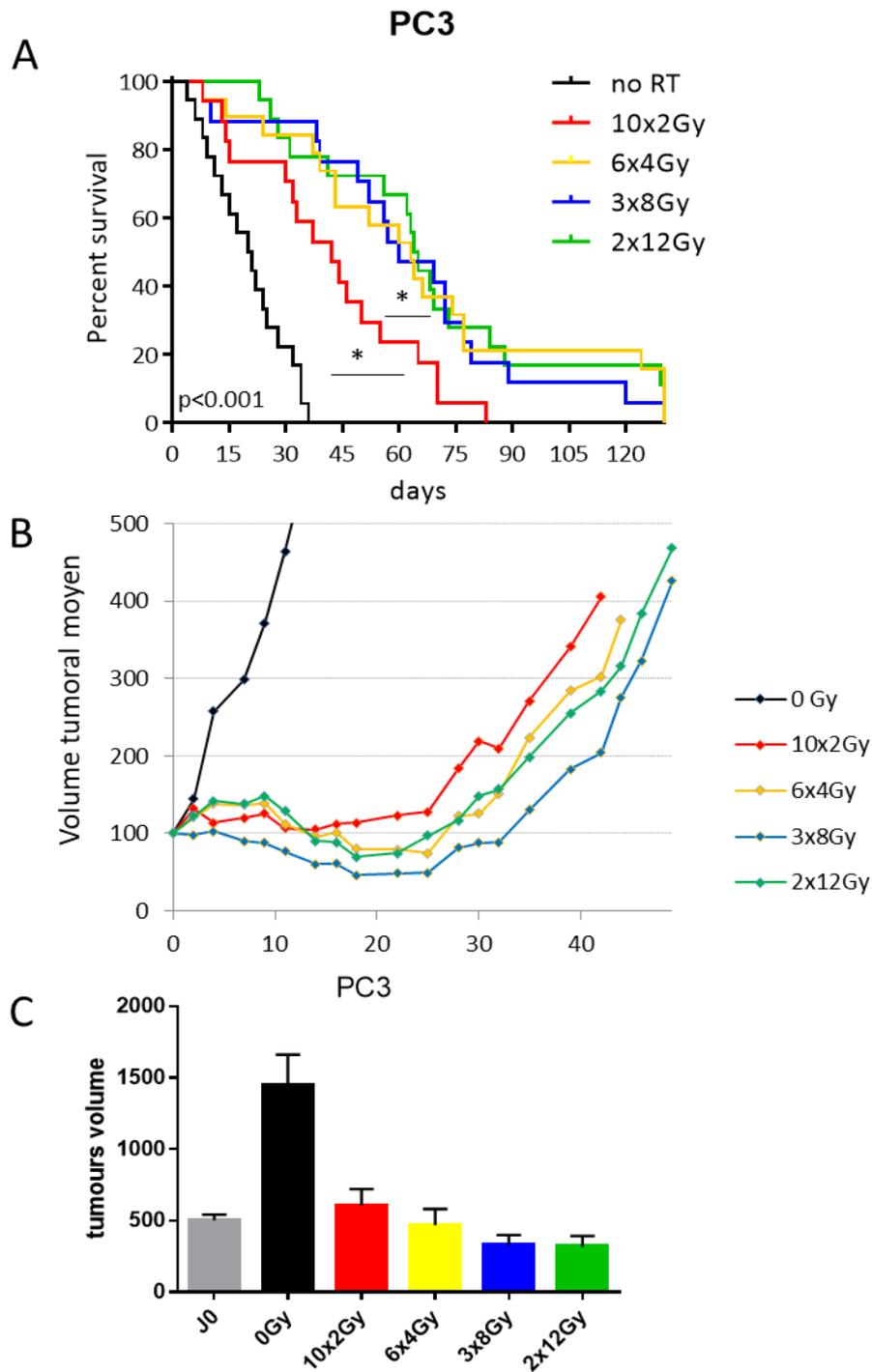
L'étalement, calculé pour être le plus représentatif possible de la clinique, était de 1 jour pour le schéma normofractionné (sauf le week-end), 2 jours pour le schéma de 4 Gy, 4 jours pour le schéma de 8 Gy, et une semaine pour le schéma de 12 Gy.

Pour comparer l'effet antitumoral des différents schémas, le temps de croissance nécessaire pour atteindre le volume seuil de 2000 mm³ a été mesuré pour chaque souris. Des courbes de survie ont été réalisées à partir des mesures collectées. Le volume moyen des tumeurs au premier jour de radiothérapie était de 167 mm³. Dans tous les schémas de fractionnement, la croissance tumorale a été ralentie par la radiothérapie. Dans les deux modèles, l'effet des schémas hypofractionnés était supérieur à l'effet du schéma normofractionné. Malgré d'importants écarts de BED, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents schémas hypofractionnés.

Dans le modèle PC3, le volume tumoral était stabilisé par la radiothérapie normofractionnée et réduit par la radiothérapie hypofractionnée. La survie médiane était de 20 jours dans le groupe non irradié, 42 jours dans le groupe 10 x 2 Gy, et 63, 60 et 64 jours respectivement dans les groupes 6 x 4 Gy, 3 x 8 Gy et 2 x 12 Gy.

Dans le modèle LLC, la croissance tumorale était beaucoup plus rapide et aucun des schémas de fractionnement n'a permis d'obtenir de réduction du volume tumoral. Un simple ralentissement de la croissance des tumeurs a été observé, le délai moyen de survie étant de 16 jours pour les schémas 10 x 2 Gy, 6 x 4 Gy et 3 x 8 Gy, de 17 jours pour le schéma 2 x 12 Gy, versus 13 jours pour le groupe non irradié.

Figure 20: Effet du fractionnement sur la croissance des tumeurs PC3



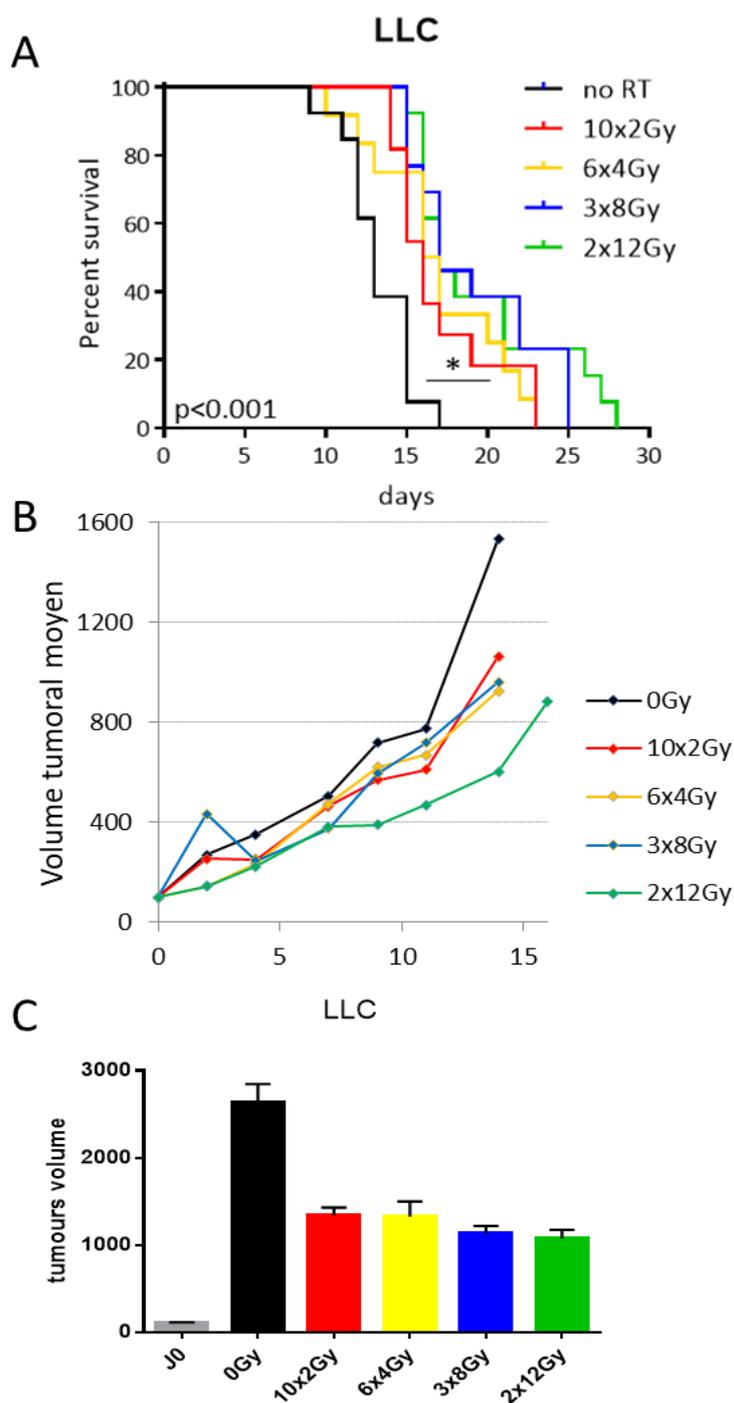
A. Pseudo-courbes de survie (Analyse selon Kaplan-Meier) des tumeurs PC3 traitées par les différents schémas de radiothérapie fractionnée.

B. Volume moyen des tumeurs PC3 traitées par les différents schémas de fractionnement, normalisées à J0 (premier jour d'irradiation).

C. Volume moyen des tumeurs PC3 à J0 (barre grise), puis à J14 (barre noire : non irradiées, barres colorées : schémas fractionnés)

(A,B,C) N=2. Valeurs moyennes pour n≥18 par groupe

Figure 21 : Effet du fractionnement sur la croissance des tumeurs LLC



A. Pseudo-courbes de survie (Analyse selon Kaplan-Meier) des tumeurs LLC traitées par les différents schémas de radiothérapie fractionnée.

B. Volume moyen des tumeurs LLC traitées par les différents schémas de fractionnement, normalisées à J0 (premier jour d'irradiation).

C. Volume moyen des tumeurs LLC à J0 (barre grise), puis à J14 (barre noire : non irradiées, barres colorées : schémas fractionnés)

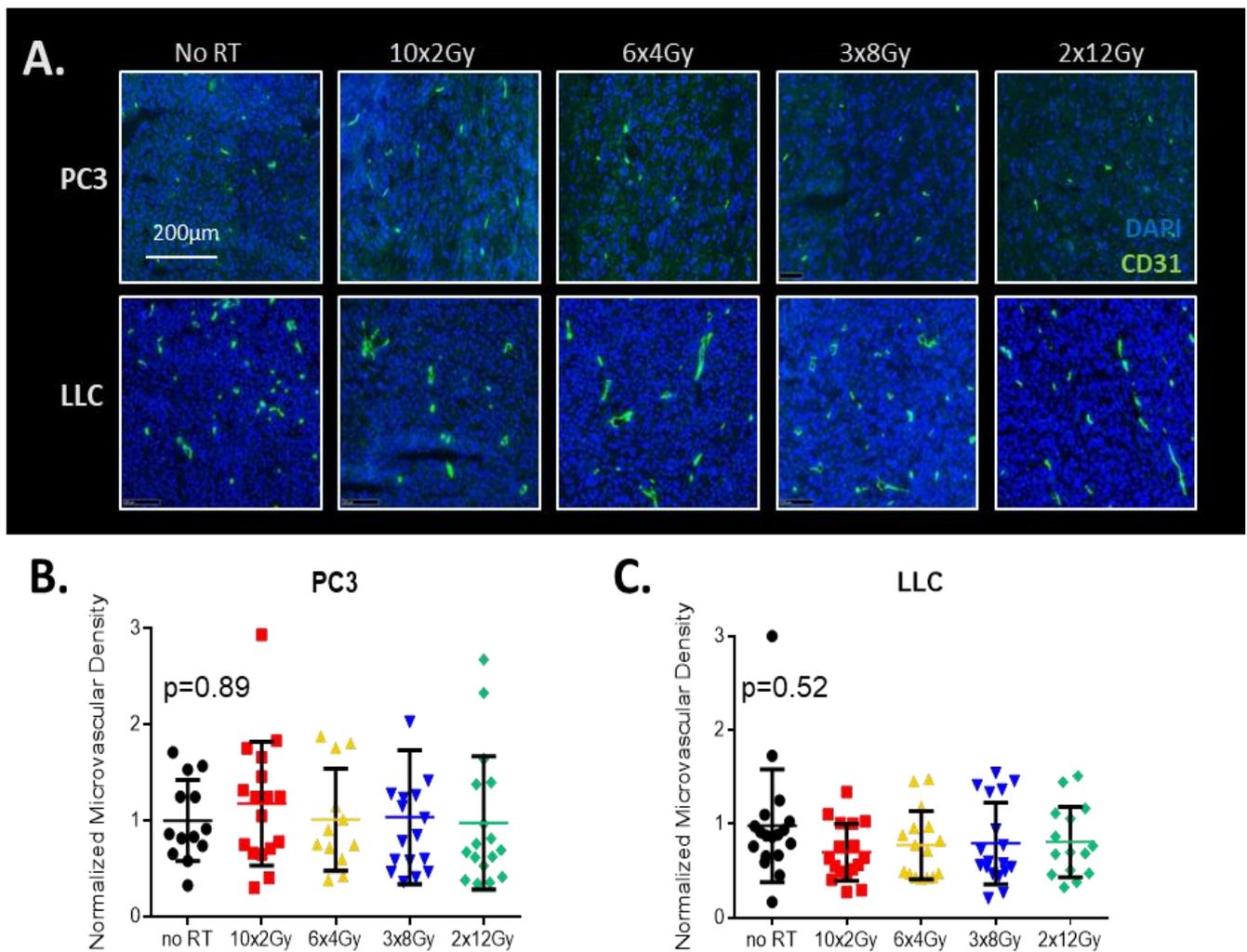
(A,B,C) N=2. Valeurs moyennes pour n≥15 par groupe

1.2. EFFET DU FRACTIONNEMENT SUR LA DENSITE MICROVASCULAIRE

Densité microvasculaire à J14

Le microenvironnement vasculaire a été analysé au 14^{ème} jour après le début de l'irradiation (J15). Pour chaque schéma de fractionnement, cela correspondait au moment théorique de la séance de radiothérapie suivante. La densité microvasculaire mesurée variait de 59 à 135 vaisseaux/mm². Aucune différence significative entre les différents schémas de fractionnement et le contrôle n'a été mise en évidence, qu'il s'agisse du modèle PC3 ou LLC.

Figure 22 : Densité microvasculaire à J15



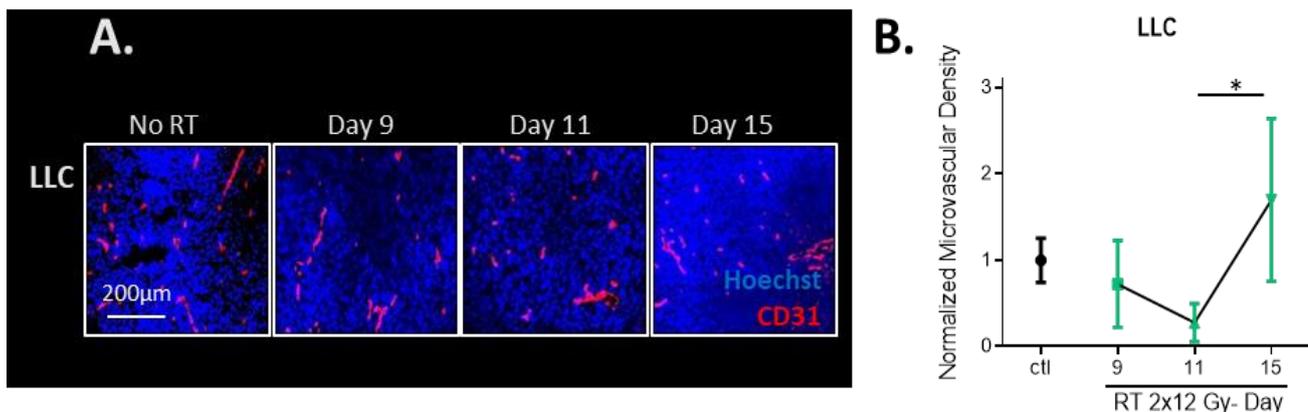
A. Images de microscopie à fluorescence avec marquage des vaisseaux (CD31, vert) des tumeurs PC3 (ligne du haut) et LLC (ligne du bas) après les différents schémas de fractionnement.

B,C. Quantification de la densité microvasculaire dans les tumeurs PC3 (B) et LLC (C) après les différents schémas de fractionnement. Le groupe contrôle était sacrifié à J15, en même temps que les autres groupes. N=2. Valeurs moyennes pour n≥18 par groupe

Etude cinétique, modèle LLC

Une expérience « cinétique » a été réalisée après le schéma le plus hypofractionné de 2 x 12 Gy, sur le modèle LLC. Les différents paramètres du microenvironnement vasculaire ont été analysés 1, 3 et 7 jours après la seconde séance d'irradiation (soit à J9, J11 et J15, contre J15 uniquement dans l'expérience dite « de fractionnement »). Une réduction de la densité microvasculaire au 3^{ème} jour a ainsi été mise en évidence ($p=0.006$ vs J15). Au 7^{ème} jour, la densité microvasculaire avait retrouvé le niveau du contrôle.

Figure 23 : Étude cinétique de la densité microvasculaire après 2 x 12 Gy, modèle LLC



Le nombre de jours était compté à partir du premier jour d'irradiation, ainsi J9, J11 et J15 correspondent à 1, 3 et 7 jours après la dernière séance.

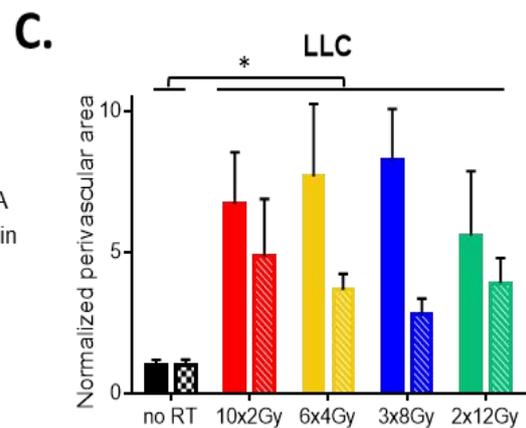
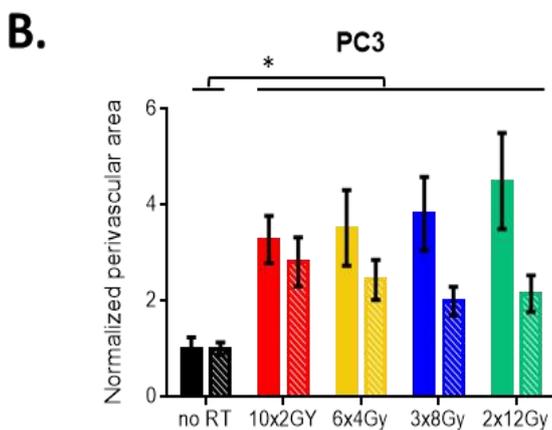
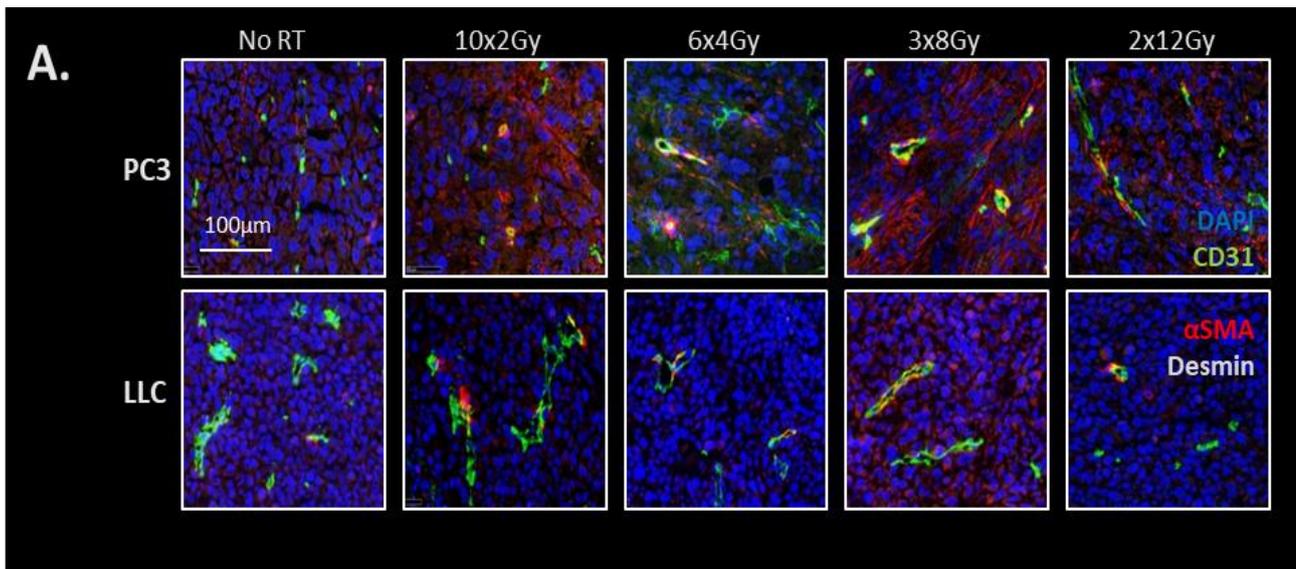
Images de microscopie à fluorescence avec marquage des vaisseaux (CD31, rouge) des tumeurs LLC après irradiation selon le schéma de 2 x 12 Gy.

Quantification de la densité microvasculaire dans les tumeurs LLC après 2 x 12 Gy. Le groupe contrôle a été prélevé à J9. Données pour $n \geq 7$ par groupe.

1.3. LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE LA COUVERTURE PERICYTAIRE, QUEL QUE SOIT LE SCHEMA DE FRACTIONNEMENT

La radiothérapie normofractionnée augmente la couverture péricytaire des vaisseaux tumoraux. Pour savoir si cet effet est valable avec des schémas hypofractionnés, et pour connaître l'impact de la dose par fraction sur la couverture des vaisseaux, nous avons recueilli sur les tumeurs à J14 le niveau d'expression péricytaire des marqueurs α SMA et desmin. Dans les deux modèles, les tumeurs des groupes non irradiés présentaient un faible indice de couverture péricytaire. Après radiothérapie, l'indice de couverture était multiplié par 2 dans les tumeurs PC3 et par 8 dans les tumeurs LLC. Dans chaque modèle, l'augmentation était similaire quel que soit le schéma de fractionnement. De façon cohérente, les indices α SMA et desmin suivaient une évolution comparable dans toutes les conditions.

Figure 24 : Couverture péricytaire à J15



A. Images de microscopie à fluorescence avec marquage des vaisseaux (CD31, vert) et des péricytes (α SMA, rouge et Desmin, blanc) des tumeurs PC3 (ligne du haut) et LLC (ligne du bas) après les différents schémas de fractionnement.

B,C. Quantification des index de couverture péricytaire α SMA et Desmin dans les tumeurs PC3 (B) et LLC (C) après les différents schémas de fractionnement. Les groupe contrôle étaient sacrifié à J15, en même temps que les autres groupes. N=2. Valeurs moyennes pour $n \geq 18$ par groupe.

1.4. AMELIORATION DE L'HYPOXIE ET DE LA PERFUSION, DE FAÇON DOSE ET TEMPS-DEPENDANTE

Hypoxie à J15

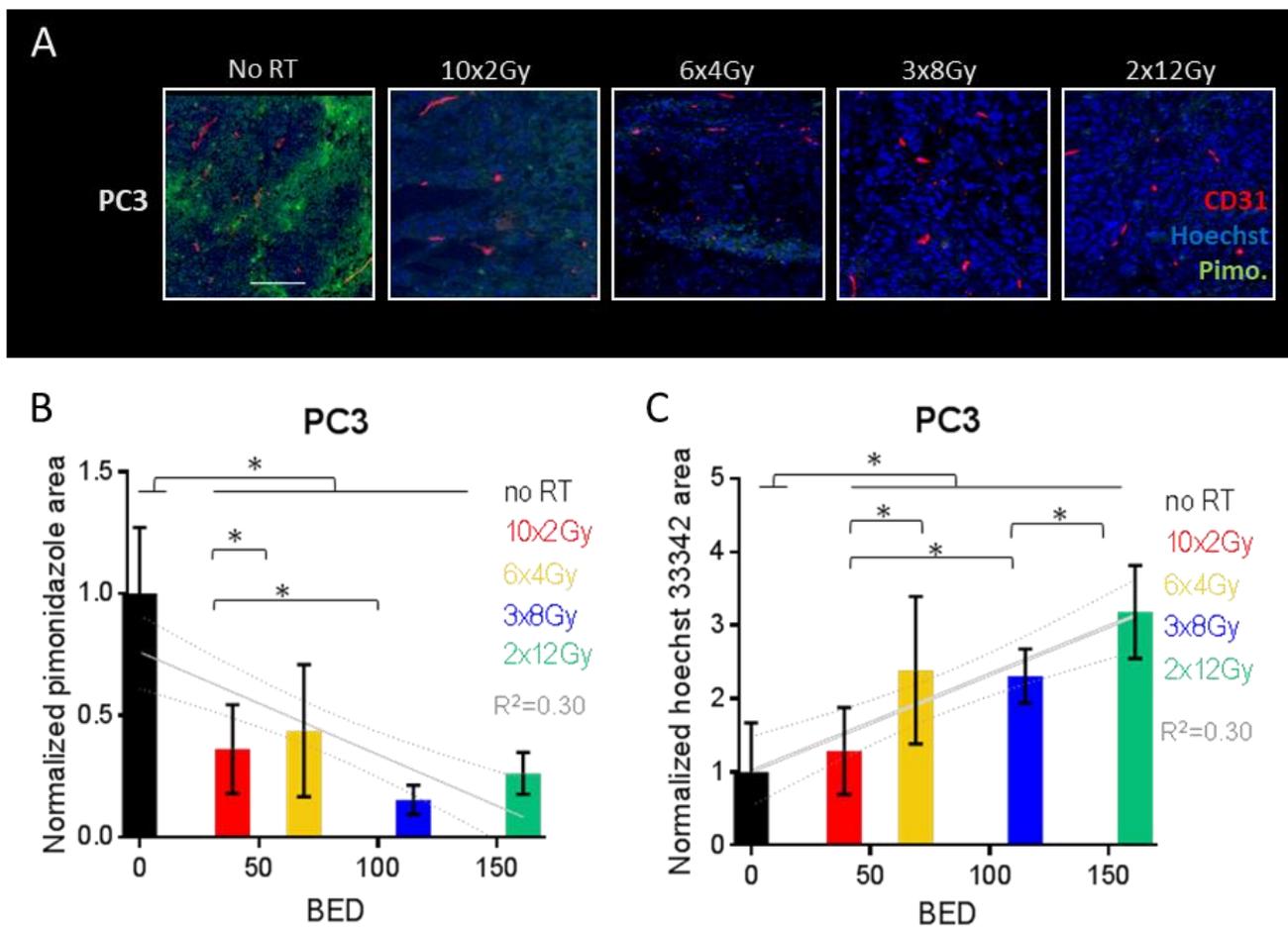
L'hypoxie sévère et la perfusion sanguine ont été évaluées via la surface de coupe marquée par le pimonidazole et le Hoechst 33342.

Dans les tumeurs PC3 non irradiées, la surface hypoxique moyenne était de 9 %. Après radiothérapie, elle se situait entre 2 et 4 %, soit une réduction de 74 à 85 % de la surface

hypoxique. La réduction de la surface hypoxique était d'autant plus marquée que la dose par fraction était importance. Une corrélation faible entre la BED et la surface hypoxique a été relevée ($R^2=0.30$).

Les tumeurs LLC étaient de base bien plus hypoxiques que les tumeurs PC3 : la surface hypoxique moyenne était de 29% dans le groupe contrôle. Après radiothérapie, la réduction de la surface hypoxique était hétérogène : elle était de 23 % dans le bras standard (réduction de 21 %) et de 18 % dans le bras 6 x 4 Gy (réduction de 38 %, $p=0.03$), mais n'était pas réduite dans les groupes 3 x 8 Gy et 2 x 12 Gy.

Figure 25 : Hypoxie et perfusion à J15 dans les tumeurs PC3

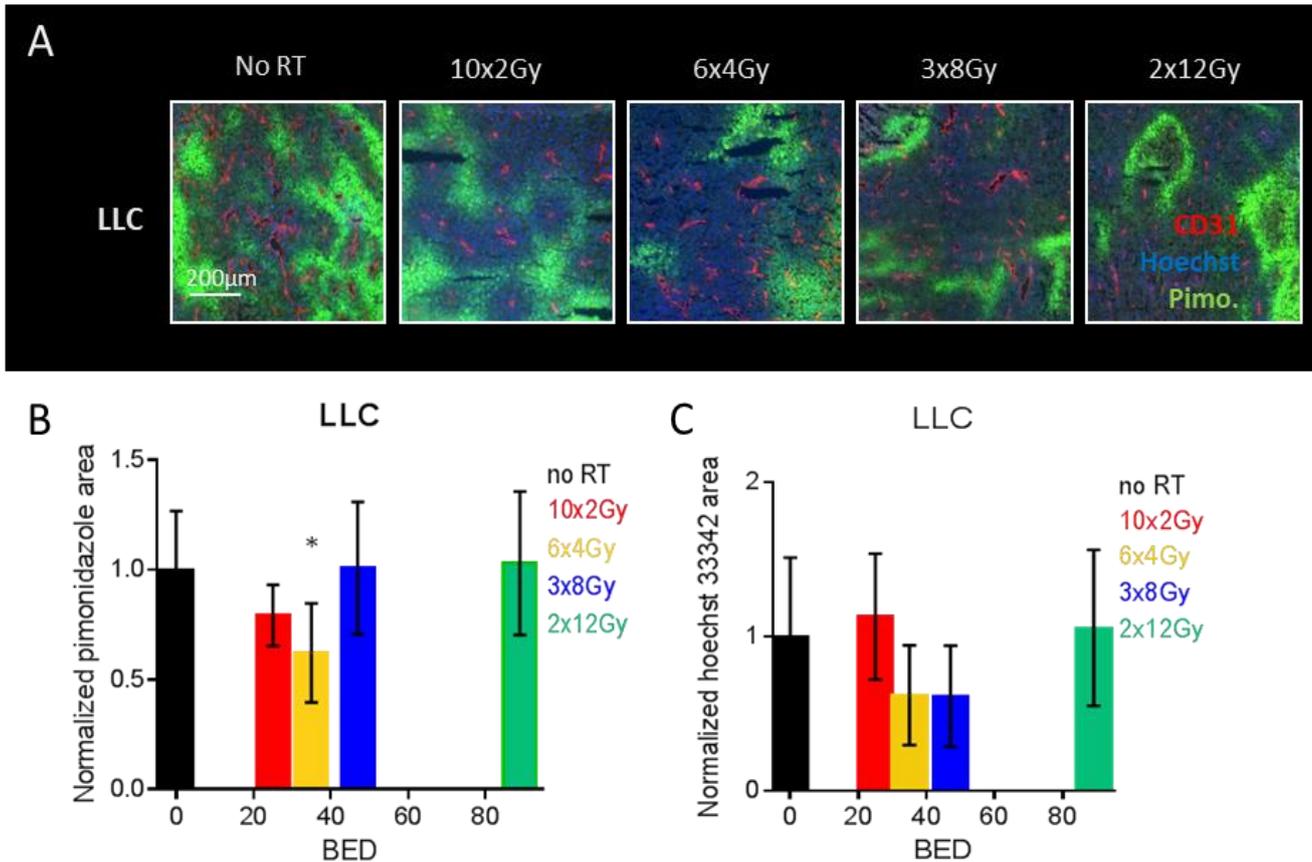


A. Images de microscopie à fluorescence avec marquage des vaisseaux (CD31, rouge), de l'hypoxie sévère (pimonidazole, vert) et de la perfusion par le Hoechst 33342 (bleu) des tumeurs PC3 après les différents schémas de fractionnement.

B,C. Quantification de la surface hypoxique (B) et perfusée (C) dans les tumeurs PC3 après les différents schémas de fractionnement. Chaque colonne est placée sur l'abscisse selon la BED calculée pour chaque schéma de fractionnement. En gris est représentée la courbe de régression linéaire liant la BED et le niveaux d'hypoxie /perfusion

N=2. Valeurs moyennes pour $n \geq 18$ par groupe.

Figure 26 : Hypoxie et perfusion à J15 dans les tumeurs LLC



A. Images de microscopie à fluorescence avec marquage des vaisseaux (CD31, rouge), de l'hypoxie sévère (pimonidazole, vert) et de la perfusion par le Hoechst 33342 (bleu) des tumeurs LLC après les différents schémas de fractionnement.

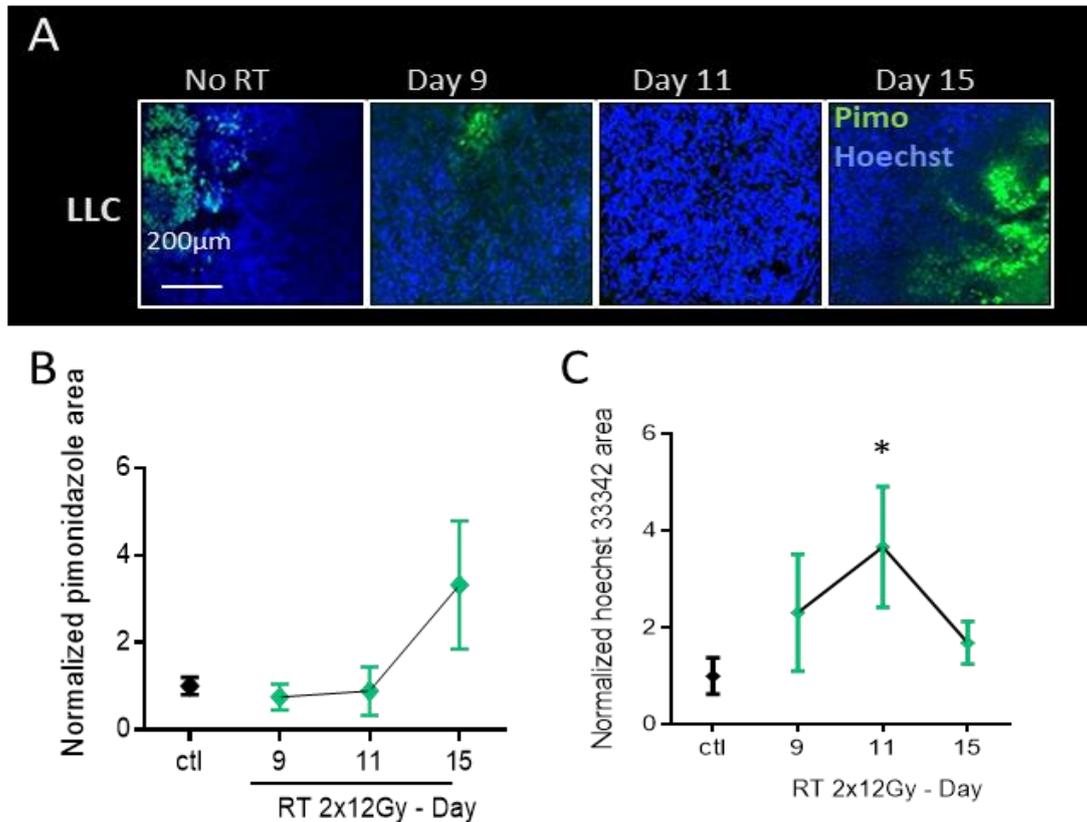
B,C. Quantification de la surface hypoxique (B) et perfusée (C) dans les tumeurs LLC après les différents schémas de fractionnement. Chaque colonne est placée sur l'abscisse selon la BED calculée pour chaque schéma de fractionnement.

N=2. Valeurs moyennes pour n≥15 par groupe.

Etude cinétique, modèle LLC

Les tumeurs LLC présentant une croissance particulièrement rapide, l'hypothèse d'une compensation de la réduction d'hypoxie par la repopulation dans les schémas les plus hypofractionnés (où l'étalement inter fraction était le plus important) a été soulevée. La mesure « cinétique » de l'hypoxie 1, 3 et 7 jours après la seconde séance dans le schéma 2 x 12 Gy a été réalisée. La surface hypoxique n'était néanmoins pas réduite dans les jours suivant l'irradiation mais seulement « contenue » à un niveau stable jusqu'au 3^{ème} jour avant une augmentation hétérogène au 7^{ème} jour.

Figure 27 : étude cinétique de l'hypoxie et de la perfusion dans le modèle LLC



Le nombre de jours est compté à partir du premier jour d'irradiation, ainsi J9, J11 et J15 correspondent à 1, 3 et 7 jours après la dernière séance.

A. Images de microscopie à fluorescence avec marquage de l'hypoxie sévère (pimonidazole, vert) et de la perfusion du Hoechst 33342 (bleu) des tumeurs LLC après irradiation selon le schéma de 2 x 12 Gy. B,C. Quantification de l'hypoxie sévère (B) et de la perfusion (C) dans les tumeurs LLC après 2 x 12 Gy. Le groupe contrôle a été prélevé à J9. Données pour $n \geq 7$ par groupe.

Perfusion

L'étude de l'hypoxie a été complétée par l'étude de la surface perfusée par le Hoechst 33342. Dans le modèle PC3, parallèlement à la réduction de l'hypoxie, la perfusion était augmentée de 28 % dans le schéma standard à 218 % dans les bras hypofractionnés. Le niveau d'augmentation était faiblement corrélé à la BED ($R^2=0.30$).

Dans le modèle LLC, aucune augmentation significative de perfusion n'a été mise en évidence à J14, quel que soit le schéma de fractionnement. L'étude « cinétique » après 2 x 12Gy montrait un doublement transitoire de la surface perfusée à J3 ($p=0.04$), avant un retour au niveau contrôle à J7.

2. INFLUENCE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT SUR LA DISTRIBUTION ET L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE

Les résultats suivants montrent que le remodelage vasculaire radio-induit existe dans les 3 modèles tumoraux LNCaP, PC3 et LLC après radiothérapie normo ou hypofractionnée. Il s'accompagne d'une amélioration de la distribution et de l'efficacité de la doxorubicine, administrée après deux semaines d'irradiation fractionnée.

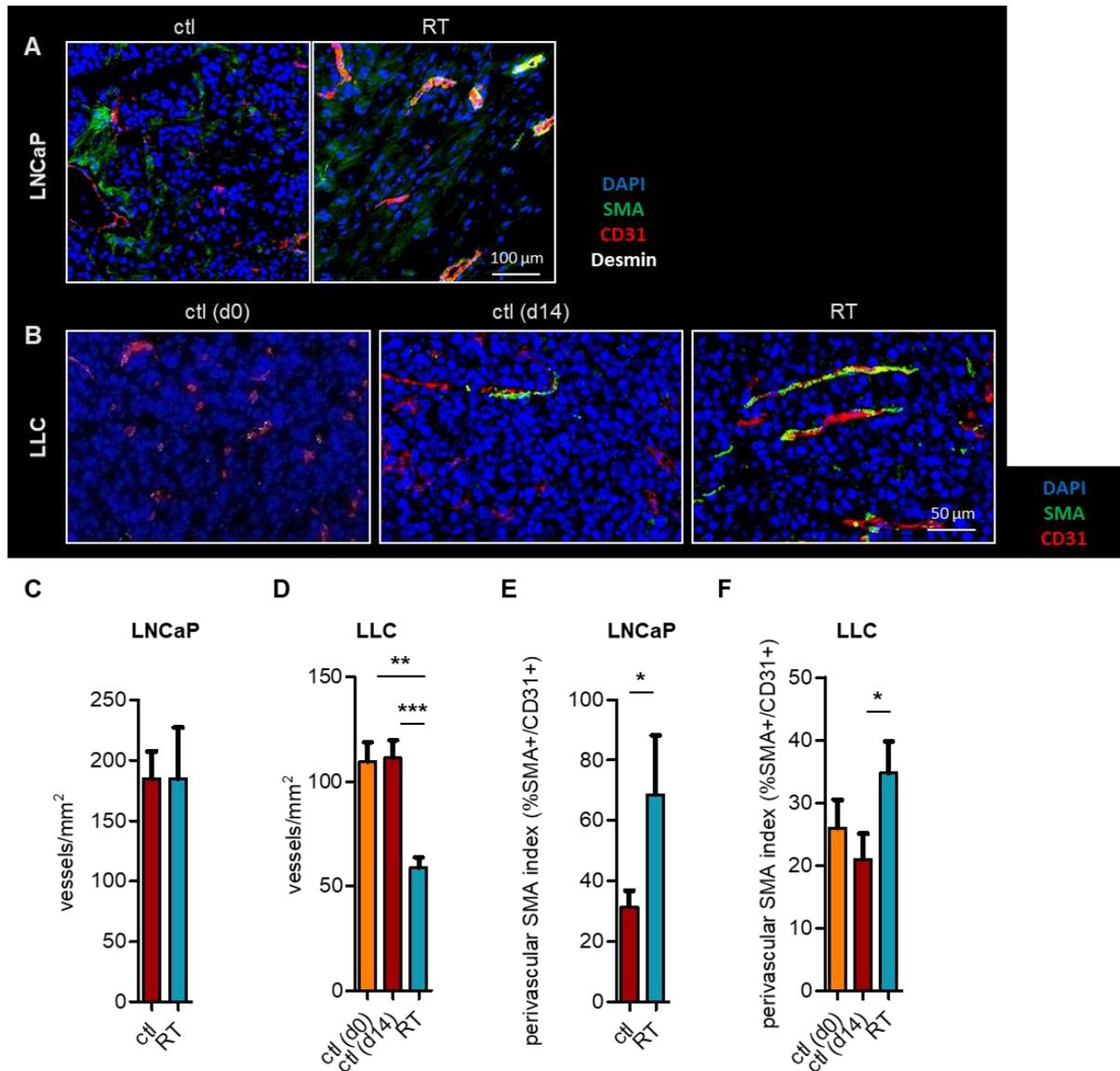
2.1. AMELIORATION RADIO-INDUITE DE LA PHYSIOLOGIE VASCULAIRE DANS DIFFERENTS MODELES TUMORAUX

Nous avons constaté, lors des précédents travaux de l'équipe sur le modèle PC3, que l'irradiation normofractionnée sur 2 semaines induisait une amélioration de la couverture péricytaire des vaisseaux tumoraux, et s'accompagnait d'une amélioration de la perfusion sanguine. Pour poursuivre ces travaux, nous avons cherché à savoir si ces résultats se confirmaient sur d'autres modèles tumoraux : le modèle LNCaP (cancer de prostate humain hormono-dépendant, à croissance lente) et le modèle LLC (cancer pulmonaire syngénique des souris C57bl/6, croissance rapide). Des tumeurs LNCaP-luciférase orthotopiques ont été induites et leur croissance surveillée par bioluminescence. Lorsque l'augmentation de la bioluminescence était linéaire (5 à 6 semaines après l'injection), les souris ont été localement irradiées selon un schéma normofractionné, sur 2 semaines. En parallèle, des tumeurs sous-cutanées LLC de volume moyen de 200 mm³ ont été irradiées selon un schéma de 2 séances de 12 Gy chaque lundi, le schéma normofractionné étant insuffisant pour contrôler la croissance tumorale. Pour le modèle LLC, 2 groupes contrôle non irradiés ont été adjoints pour améliorer la comparabilité : un groupe « contrôle J0 », correspondant au premier jour de l'expérience, dont la taille tumorale était comparable au groupe test, et un groupe « contrôle J14 », correspondant à la date de prélèvement des tumeurs, dont l'âge tumoral était comparable au groupe test. Pour le modèle LNCaP, dont la croissance est lente (et PC3 pour les résultats suivants), un groupe « contrôle J14 » était suffisant.

Dans le modèle LNCaP, le schéma 10 x 2 Gy n'a pas modifié la densité microvasculaire. Dans le modèle LLC, le schéma 2 x 12 Gy diminuait la densité microvasculaire (47%, p<0.001).

Dans les deux modèles sus-cités, une augmentation des cellules murales α SMA-positives dans les 2 μ m autour des cellules endothéliales CD31-positives a été observée après les deux semaines de radiothérapie (LNCaP : +119%, p=0.05, LLC : +65%, p=0.02). Il n'y avait pas de différence significative entre les tumeurs LLC non irradiées prélevées à J0 ou à J14.

Figure 28 : La radiothérapie fractionnée accroît la couverture vasculaire



(A,B) images de microscopie à fluorescence représentant les cellules endothéliales (CD31, rouge) et les péricytes (SMA, vert et desmin, blanc) dans les modèles de tumeurs LNCaP (A) et LLC (B).

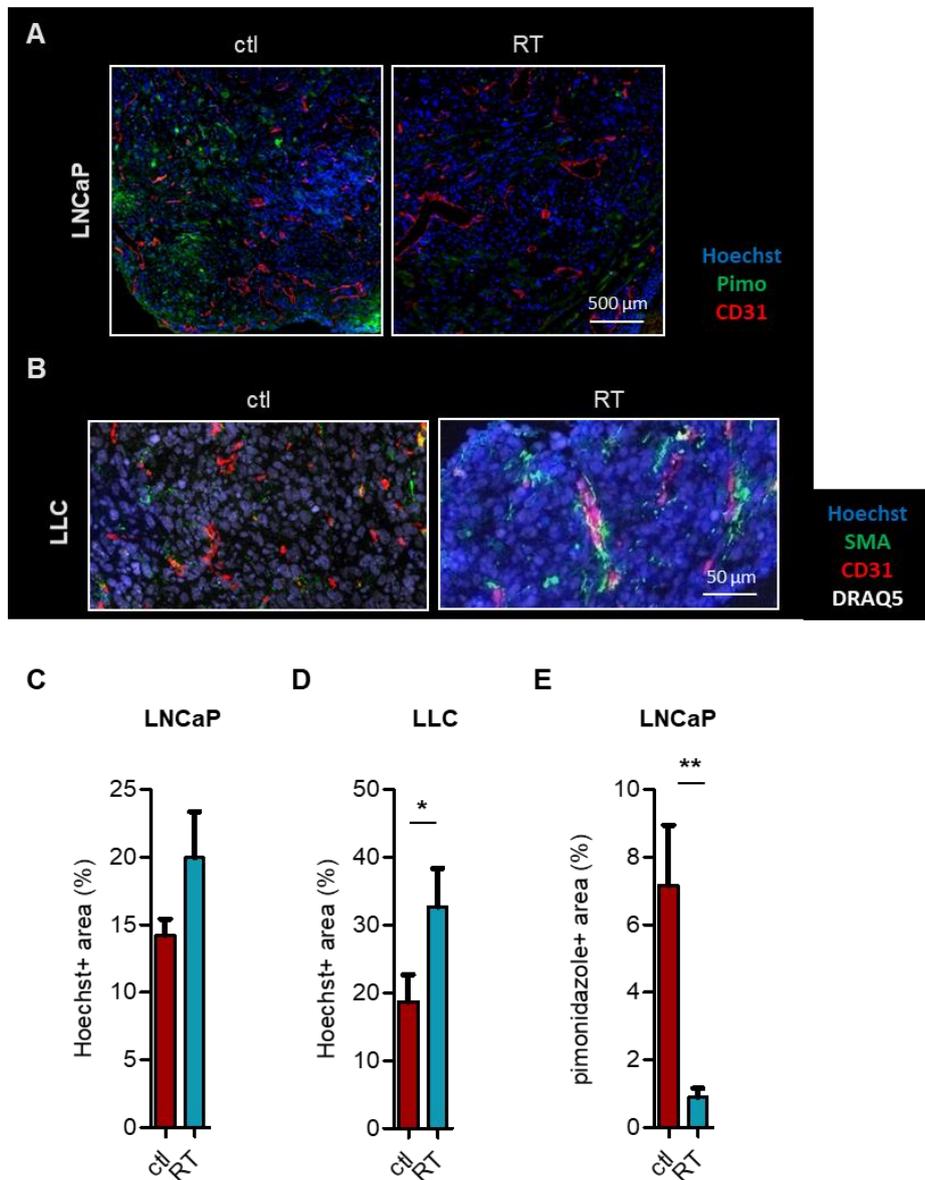
(C,D) Densité microvasculaire dans les tumeurs LNCaP (C) et LLC (D)

(E,F) Quantification de l'air SMA+ autour des vaisseaux CD31+ dans les tumeurs LNCaP (E) et LLC (F).

(C-F) valeurs moyennes pour $n \geq 5$ (LNCaP) et $n \geq 9$ (LLC)

Sur le plan fonctionnel, la radiothérapie favorisait la pénétration nucléaire du Hoechst 33342 dans les tumeurs LNCaP (+40%, $p=0.08$) et dans les tumeurs LLC (+75%, $p=0.04$). La surface hypoxique marquée par le pimonidazole était également réduite dans les tumeurs LNCaP (-88%, $p=0.004$).

Figure 29 : La radiothérapie fractionnée augmente la perfusion et réduit l'hypoxie



(A,B) images de microscopie à fluorescence représentant les tumeurs LNCaP (A) et LLC (B) après injection de pimonidazole et /ou Hoechst 33342.

(C,D) Quantification du ratio aire Hoechst 33342 / aire totale dans les tumeurs LNCaP (C) et LLC (D)

(E) Quantification du ratio aire pimonidazole+ / aire totale dans les tumeurs LLC

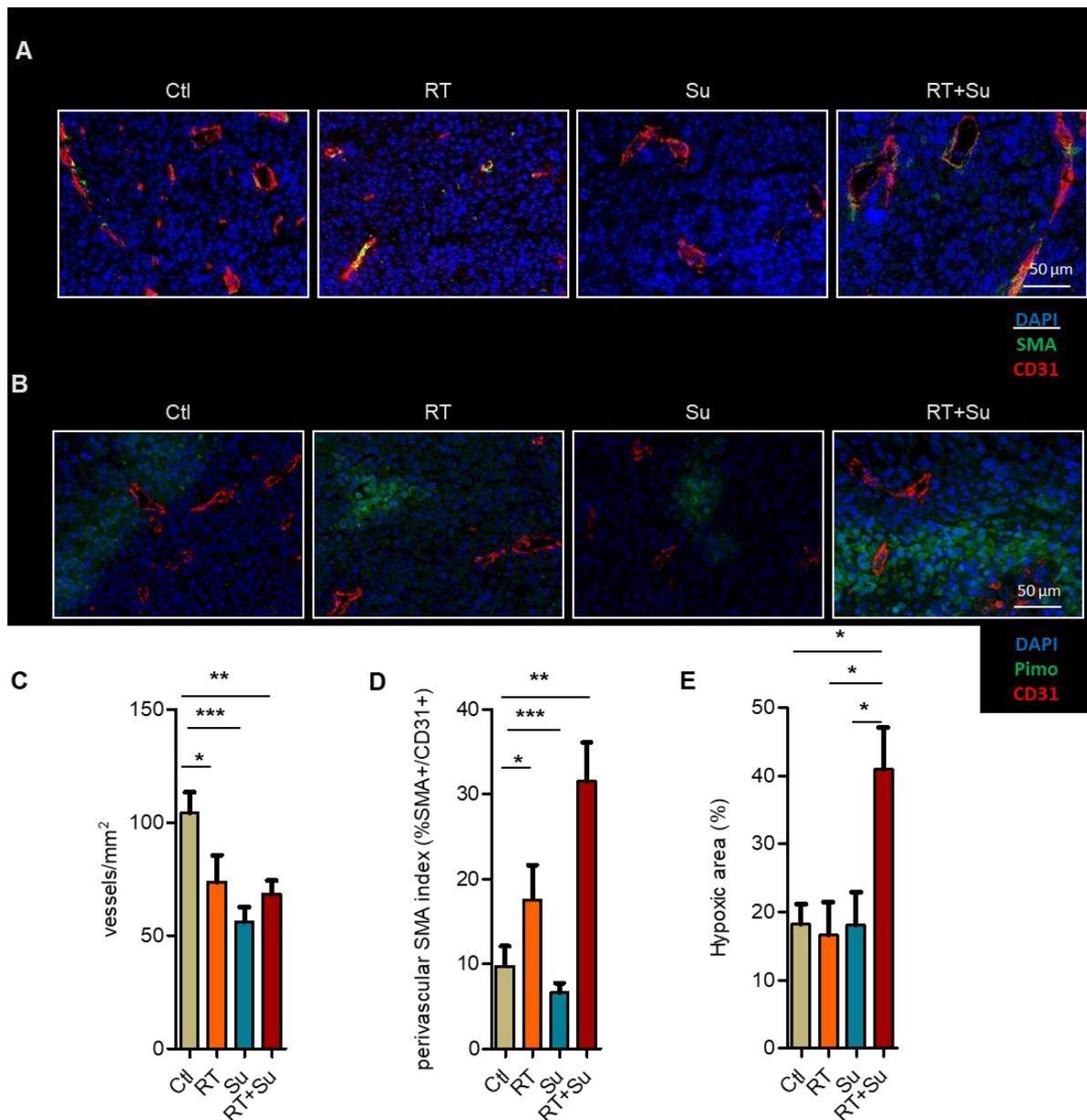
(C-E) valeurs moyennes pour $n \geq 5$ (LNCaP) et $n \geq 9$ (LLC)

Des résultats similaires ont été montrés précédemment dans le modèle PC3, à la fois dans ce travail et dans les articles précédents de l'équipe (80). L'addition de ces résultats dans des modèles tant syngénique (LLC) qu'immunodéprimés (LNCaP, PC3) montre plus généralement que la radiothérapie améliore la physiologie vasculaire des tumeurs solides après 2 semaines de traitement.

La radiothérapie est fréquemment combinée avec un ou des traitements systémiques néoadjuvants ou concomitants. Parmi eux, les agents anti-angiogéniques semblent être les plus susceptibles d'affecter le remodelage vasculaire radio-induit. Nous avons donc cherché à savoir, par la suite, si le remodelage vasculaire radio-induit était compatible avec le sunitinib (Inhibiteur des récepteurs à tyrosine kinase VEGFR et PDGFR utilisé dans le traitement standard des tumeurs solides, dont les effets conflictuels sur la normalisation vasculaire ont été reportés (118)). Notre choix s'est porté sur le modèle LLC car des travaux *in vitro* reportent une réponse cellulaire au sunitinib dans les cellules PC3 (119). Les souris avec tumeurs LLC sous-cutanées palpables ont été irradiées selon le schéma 2 x 12 Gy et gavées quotidiennement avec une solution de sunitinib à 40 mg/kg, ou un placebo. Après 2 semaines de traitement, les paramètres vasculaires ont été analysés. Dans le groupe sunitinib, la densité microvasculaire était diminuée par rapport au contrôle, de façon comparable à l'effet de la radiothérapie seule dans ce modèle (contrôle : 104 vaisseaux/mm², sunitinib : 56 vaisseaux/mm², radiothérapie 74 vaisseaux/mm², contrôle vs RT p=0.02, contrôle vs sunitinib p=0.001). La combinaison sunitinib + RT ne réduisait pas plus profondément la densité microvasculaire (RT + sunitinib : 68 vaisseaux/mm², NS versus RT ou sunitinib seul). De plus, le sunitinib n'allait pas à l'encontre de l'amélioration radio-induite de la couverture péricytaire (RT + sunitinib : +224 %, p<0.0001 vs contrôle). Néanmoins, la combinaison sunitinib + RT induisait une augmentation de la surface hypoxique (contrôle : 18.2%, RT + sunitinib : 41%, p=0.01)

Figure 30 : Le remodelage vasculaire radio-induit n'est pas affecté par l'administration de sunitinib

dans les tumeurs LLC



(A) Images de microscopie à fluorescence représentant les cellules endothéliales (CD31, rouge) et les péricytes (SMA, vert) dans les tumeurs LLC traitées par RT, sunitinib ou les deux.

(B) Images de microscopie à fluorescence représentant les tumeurs LLC injectées de pimonidazole

(C) Densité microvasculaire dans les tumeurs LLC, traitées ou non par le sunitinib

(D) Quantification de l'aire SMA+ périvasculaire dans les tumeurs LLC, traitées ou non par le sunitinib

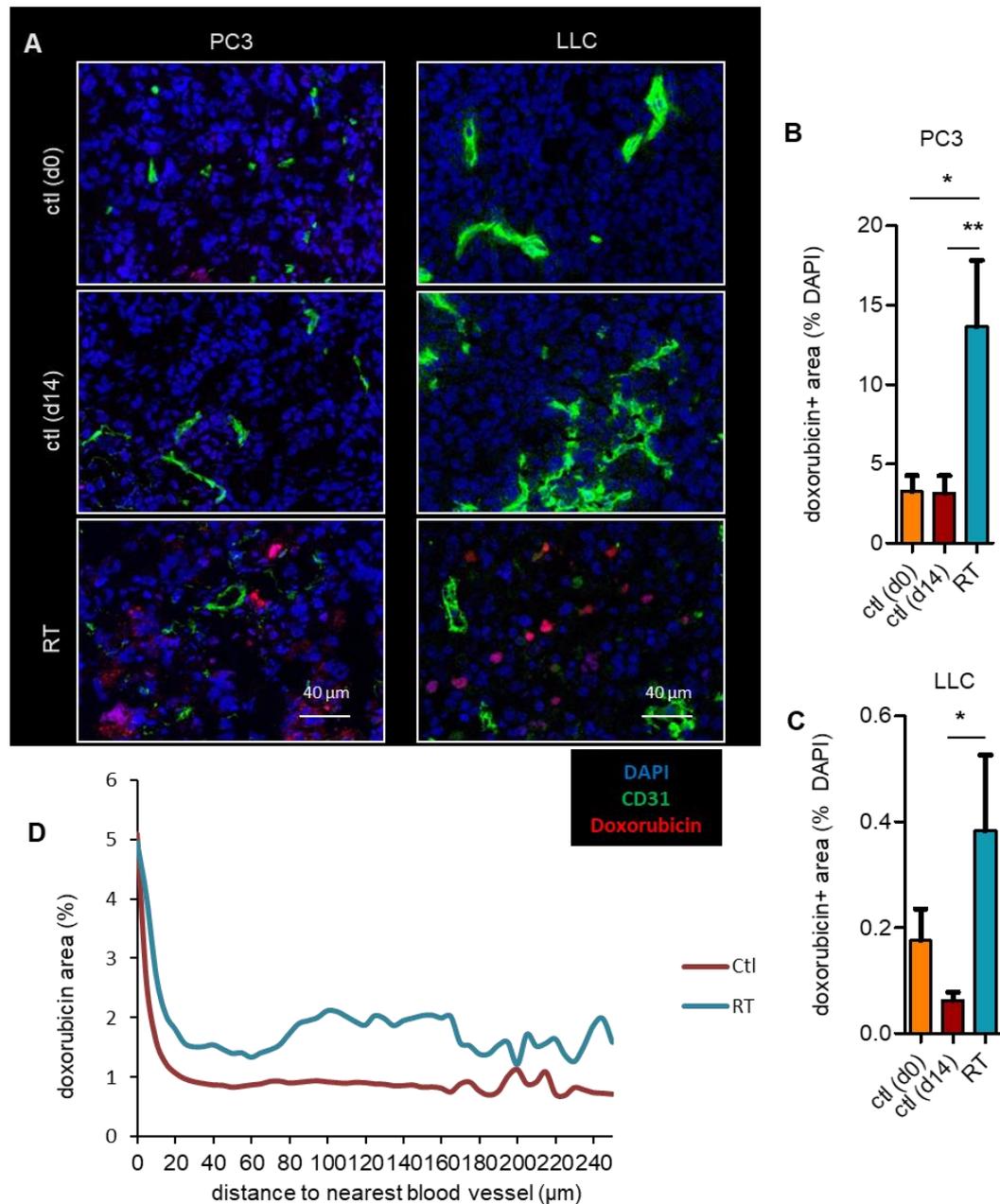
(E) Quantification du ratio aire pimonidazole+ / aire totale dans les tumeurs LLC traitées ou non par le sunitinib

(C-E) valeurs moyennes pour $n \geq 13$

2.2. LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE LA DISTRIBUTION INTRATUMORALE DE DOXORUBICINE

Afin de déterminer si le remodelage vasculaire radio-induit permettait une augmentation de la pénétration intratumorale de molécules thérapeutiques, nous avons mesuré la distribution de doxorubicine. Les tumeurs sous-cutanées PC3 et LLC ont été exposées à l'irradiation pendant 2 semaines (schéma 10 x 2 Gy et 2 x 12 Gy respectivement) afin de reproduire le remodelage vasculaire. La doxorubicine a ensuite été administrée aux souris par injection intraveineuse à la dose de 18 mg/kg et 5 minutes après injection, la tumeur était prélevée pour évaluer la distribution de doxorubicine par microscopie à fluorescence (120). Les tumeurs irradiées montraient une accumulation plus importante de doxorubicine que les tumeurs contrôle, où le niveau de détection était faible (PC3 : + 331%, $p=0.006$, LLC : + 508%, $p=0.05$). La différence ne pouvait être imputée à l'âge ni à la taille tumorale : le niveau de doxorubicine était aussi faible tant dans le groupe contrôle J0 que dans le contrôle J14. Le profil de distribution était cohérent avec une diffusion purement vasculaire, montrant une accumulation forte de doxorubicine à proximité des vaisseaux et diminuant avec la distance. Il est à noter que l'amélioration induite par la radiothérapie concernait aussi bien la distribution de doxorubicine à proximité qu'à distance des vaisseaux, comparativement au contrôle.

Figure 31 : La radiothérapie fractionnée accroît la distribution intratumorale de chimiothérapie

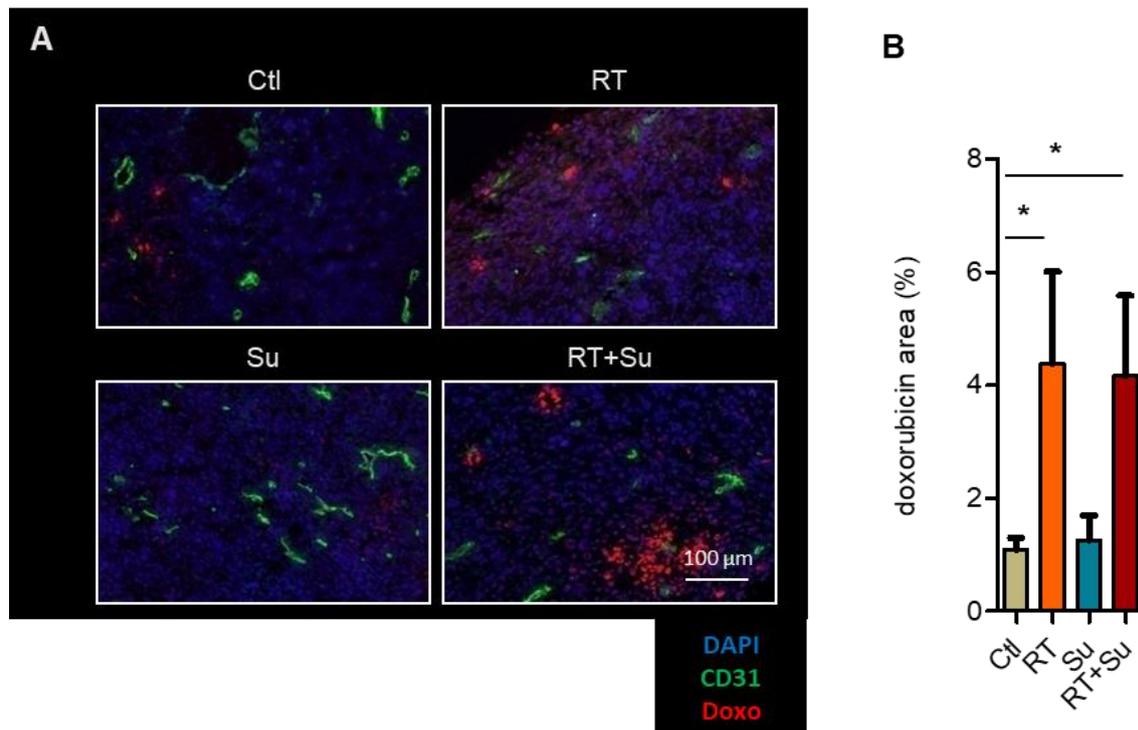


(A) Images de microscopie à fluorescence représentant tumeurs PC3 (colonne de gauche) et LLC (colonne de droite) après injection iv de doxorubicine
 (B,C) Quantification du ratio aire doxorubicine+ / aire totale dans les tumeurs PC3 (B) et LLC (C). Valeurs moyennes pour n≥9
 (D) Profil de distribution de la doxorubicine en fonction de la distance au vaisseau le plus proche dans les tumeurs PC3

Pour confirmer l'absence d'interférence du sunitinib avec le remodelage vasculaire radio-induit, nous avons évalué la distribution de doxorubicine en présence de sunitinib, selon le même plan expérimental que décrit dans le paragraphe précédent. Conformément aux attentes, la distribution de doxorubicine était améliorée dans le groupe radiothérapie par

rapport au contrôle (contrôle : 1,1 % de la surface totale, RT : 4.4 %, $p=0.02$). Le sunitinib seul n'avait pas d'impact sur la distribution de doxorubicine (sunitinib : 1.3% de la surface totale) et n'empêchait pas l'amélioration induite par la radiothérapie (RT + sunitinib : 4.4%, $p=0.02$ vs contrôle).

Figure 32 : L'amélioration de la distribution de doxorubicine n'est pas annihilée par le sunitinib



(A) Images de microscopie à fluorescence représentant tumeurs LLC après injection iv de doxorubicine selon le traitement par RT, sunitinib ou les deux

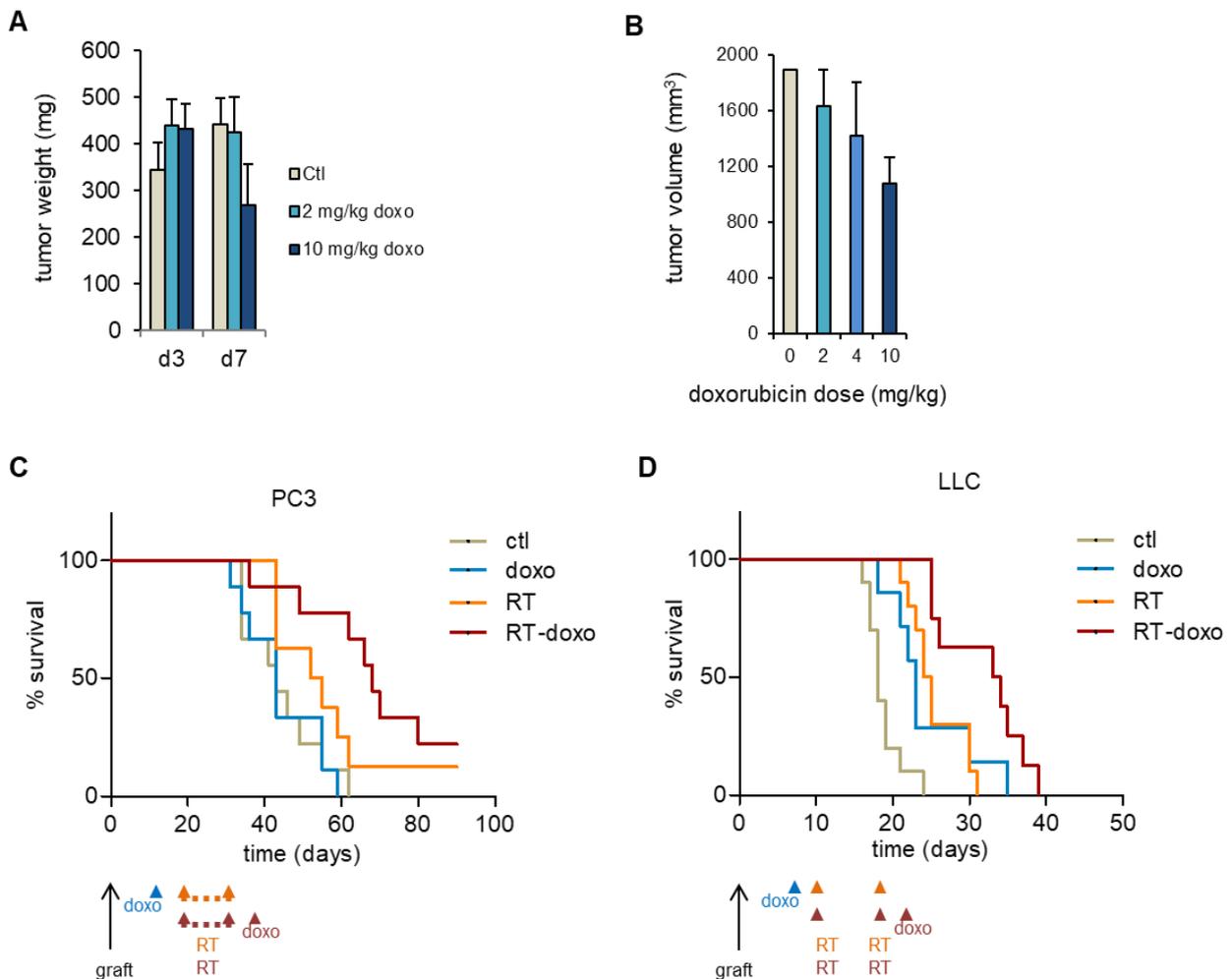
(B) Quantification du ratio aire doxorubicine+/ aire totale. Valeurs moyennes pour $n \geq 13$

2.3. LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE AUGMENTE L'EFFICACITE DE LA DOXORUBICINE

L'efficacité de la chimiothérapie dépend fortement de la dose qui a pu être délivrée au tissu tumoral (121). La question suivante était de savoir si l'augmentation de la distribution de doxorubicine était accompagnée d'une augmentation de son efficacité. Dans un premier temps, nous avons déterminé une dose de doxorubicine dont l'effet sur la croissance tumorale était faible. Basée sur la courbe dose-réponse, la dose de 8 mg/kg administrée en intrapéritonéal a été choisie, afin d'obtenir une concentration inférieure à la concentration efficace 50 (EC50). Dans un second temps, nous avons administré cette dose de doxorubicine après irradiation fractionnée selon les schémas déjà décrits. L'injection était réalisée à J14, soit un délai minimal de 3 jours après la radiothérapie, dans le but d'éviter un effet de radiosensibilisation par la chimiothérapie. Dans le modèle PC3, le traitement après

radiothérapie améliorerait de façon significative la survie des souris comparativement à la doxorubicine ou la radiothérapie seule (survie médiane : contrôle 43 jours, doxorubicine 43 jours, RT 53.5 jours, RT + doxorubicine : 68 jours, $p < 0.0001$). Dans le modèle LLC, l'association augmentait également la survie comparativement aux groupes RT ou doxorubicine seule (survie médiane : contrôle 18 jours, doxorubicine 23 jours, RT 24.5 jours, RT + doxorubicine 33.5 jours, $p < 0.0001$).

Figure 33 : L'amélioration de l'efficacité de la doxorubicine n'est pas annihilée par le sunitinib



(A,B) poids et volume des tumeurs PC3 (A) et LLC (B) traitées par des doses croissances de doxorubicine.

(C,D) Pseudo-courbes de survie (Analyse selon Kaplan-Meier) des tumeurs PC3 (C) et LLC (D) traitées par doxorubicine seule, RT ou doxorubicine 3 jours après RT. Valeurs moyennes pour $n \geq 8$ par groupe.

3. IMAGERIE NON INVASIVE DU MICROENVIRONNEMENT PAR ECHOGRAPHIE DE CONTRASTE

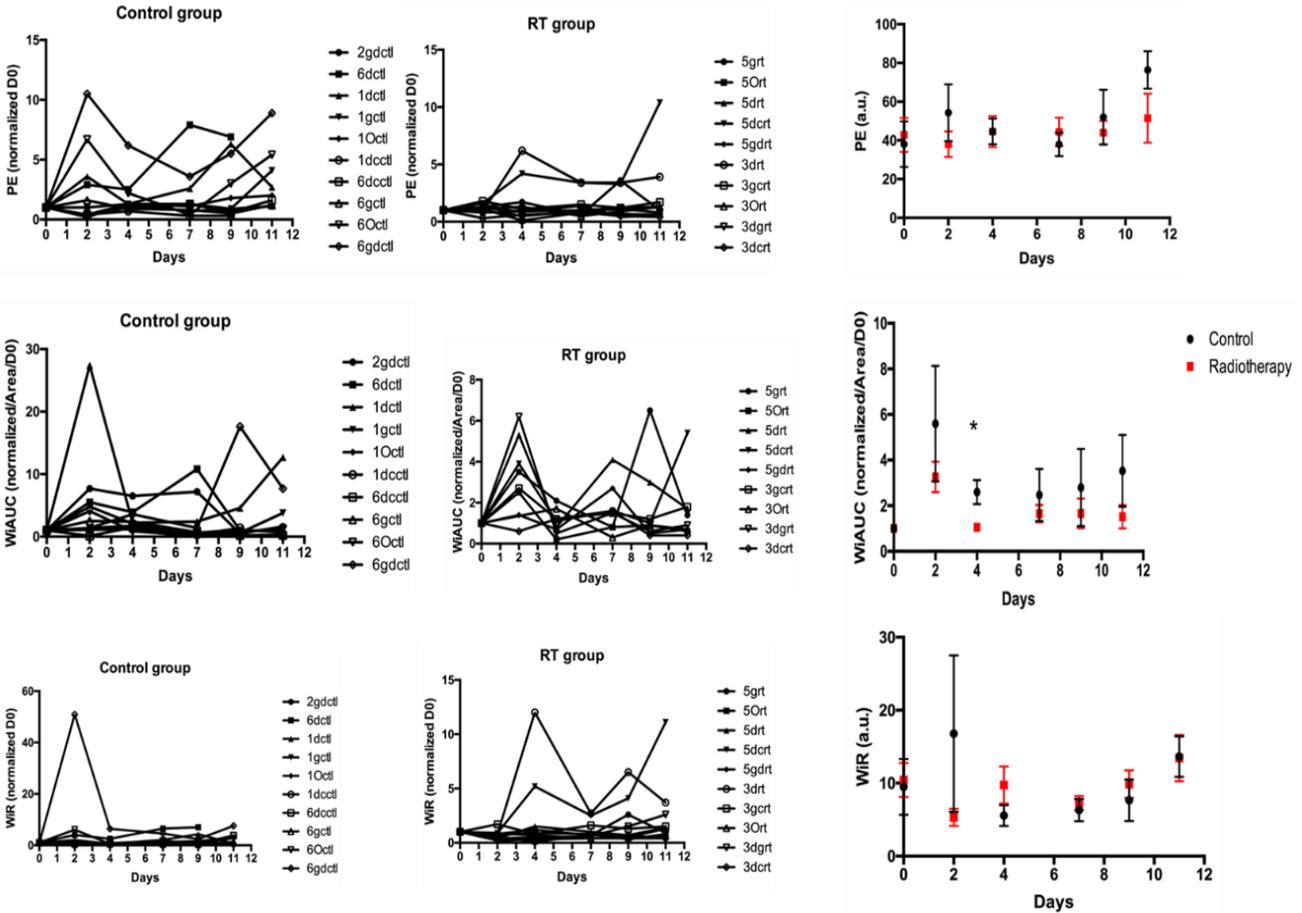
Au total, aucune franche différence entre le groupe irradié et le groupe contrôle n'a pu être mise en évidence. Des différences significatives sur plusieurs paramètres ont néanmoins été relevées en cours d'irradiation, dont le maximum se situait après 8 Gy : le volume sanguin (WiAUC) était significativement plus élevé, et les temps d'atteinte du pic RT et TTP étaient significativement plus longs dans le groupe contrôle. Schématiquement, la radiothérapie semblait d'un côté limiter le volume sanguin impliqué dans la tumeur et de l'autre accélérer sa vitesse de remplissage, de façon transitoire, confirmant l'idée d'un remodelage vasculaire radio-induit dont les effets sont dynamiques dans le temps sans pouvoir en préciser la nature ni les conséquences. Les microbulles constituent de nos jours le seul produit de contraste échographique utilisable pour quantifier la perfusion mais leur performance reste limitée en particulier pour l'imagerie des cancers (122). L'architecture anarchique des vaisseaux tumoraux combinée à une mesure de volume sanguin restreinte au secteur intravasculaire limitent la qualité et l'interprétabilité du signal. De plus, la mesure du flux sanguin ne semble pas corrélée au niveau d'oxygénation périvasculaire dans les tumeurs solides (123,124). Une piste pour améliorer la détection échographique des modifications du microenvironnement vasculaire serait de mesurer la diffusion des microbulles (125).

Figure 34 : Représentation graphique des mesures réalisées par échographie de contraste en cours de radiothérapie normofractionnée sur le modèle PC3

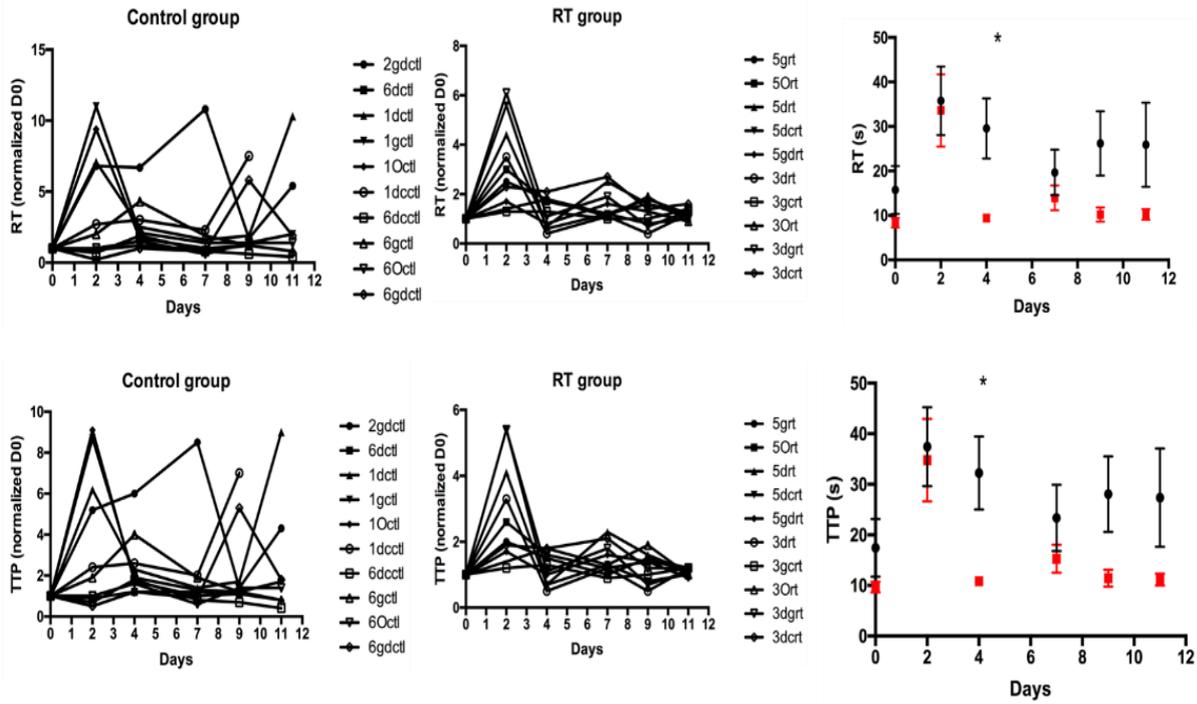
La colonne de gauche représente les données individuelles des tumeurs non irradiées, la colonne centrale représente les données individuelles des tumeurs recevant une irradiation normofractionnée, la colonne de droite représente la moyenne pour chaque groupe.

- A. Paramètres spatiaux (normalisés par rapport à J0) : Perfusion enhancement (PE), Wash-in Area under the curve (WiAUC), Wash-in Rate (WiR)
- B. Paramètres temporels (normalisés par rapport à J0) : Rise Time (RT), Time to peak (TTP)
- C. Indice de perfusion (normalisé par rapport à J0 et par l'aire de chaque coupe tumorale)

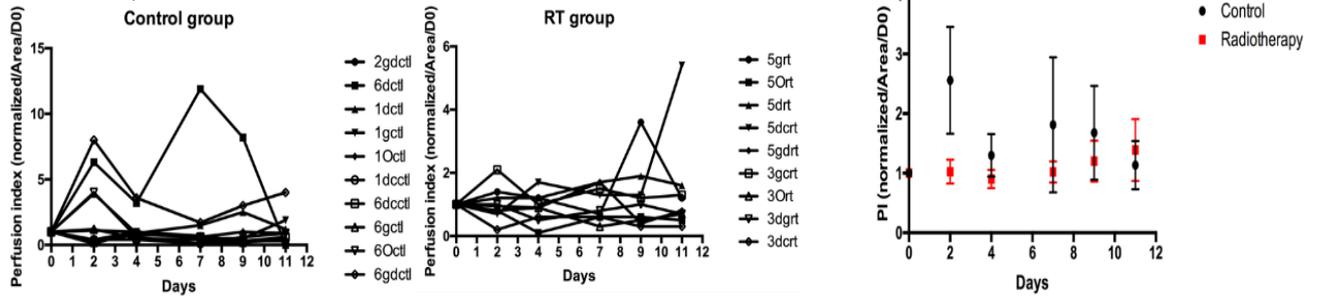
A. Paramètres spatiaux



B. Paramètres temporels



C. Indice de perfusion

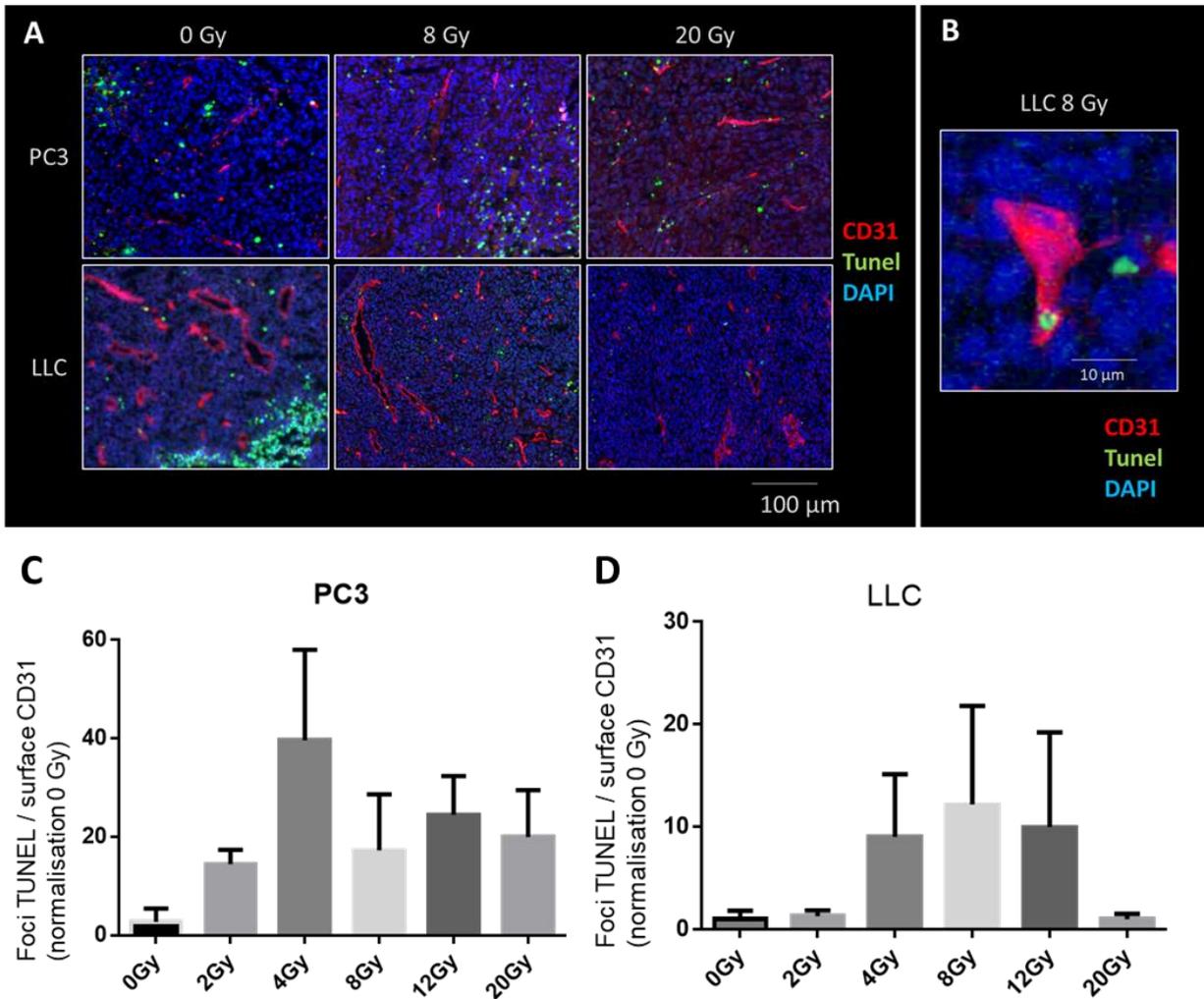


4. MORT CELLULAIRE PRECOCE

Suite aux travaux de Paris et Garcia-Barros montrant l'apoptose rapide et importante des cellules endothéliales au-delà de 7 Gy, nous pouvions envisager une réduction massive du nombre des vaisseaux tumoraux. Pourtant nous n'avons pas observé ce phénomène, même après les plus fortes doses par fraction. L'analyse « cinétique » après la seconde séance d'irradiation à 12 Gy dans le modèle LLC suggère néanmoins une baisse transitoire de la densité microvasculaire au troisième jour (non significative), rapidement et totalement compensée 4 jours plus tard. Nous avons donc cherché à comprendre dans un premier temps l'impact d'une séance unique d'irradiation sur la mort des cellules endothéliales au sein de nos modèles.

Les proportions de cellules endothéliales TUNEL-positives sont présentées sur les graphiques suivants. La proportion de cellules TUNEL-positives croît avec la dose délivrée pour les cellules endothéliales comme pour l'ensemble des cellules mais curieusement, cette tendance s'inverse au-delà des 8 à 12 Gy, avec un nombre inférieur de cellules TUNEL-positives à 20 Gy.

Figure 35 : Mort cellulaire quatre heures après une dose unique d'irradiation



(A) Images de microscopie à fluorescence représentant les tumeurs PC3 (ligne du haut) et LLC (ligne du bas) après une dose unique de 0, 8 ou 20 Gy

(B) Image issue d'une des tumeurs LLC irradiées à une dose unique de 8 Gy, représentant le détail d'un vaisseau dont une cellule CD31+ présente un marquage TUNEL nucléaire positif

(C,D) Quantification du ratio nombre de foci TUNEL+ / aire CD31+ dans les tumeurs PC3 (C) et LLC (D). Valeurs moyennes pour n=5

5. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE

Afin de dégager une vision plus globale des réponses tumorale et microenvironnementale à l'irradiation, les transcriptomes des deux modèles tumoraux, avant et après irradiation fractionnée, ont été analysés et comparés. Les résultats sont présentés ci-dessous. Outre la mise en jeu de voies de régulation du cycle cellulaire comme p53, Wnt ou RAS, il est intéressant de noter que dans les deux modèles, les voies concernant l'angiogenèse, PDGF, EGF ou l'endothéline sont présentes, confirmant l'importance de la réponse vasculaire au sein du microenvironnement. Un autre résultat marquant est la prépondérance des voies de réponse immunitaires spécifiques. Interleukines, cytokines, voies d'activation des lymphocytes T ou encore FAS sont présents en proportion importante.

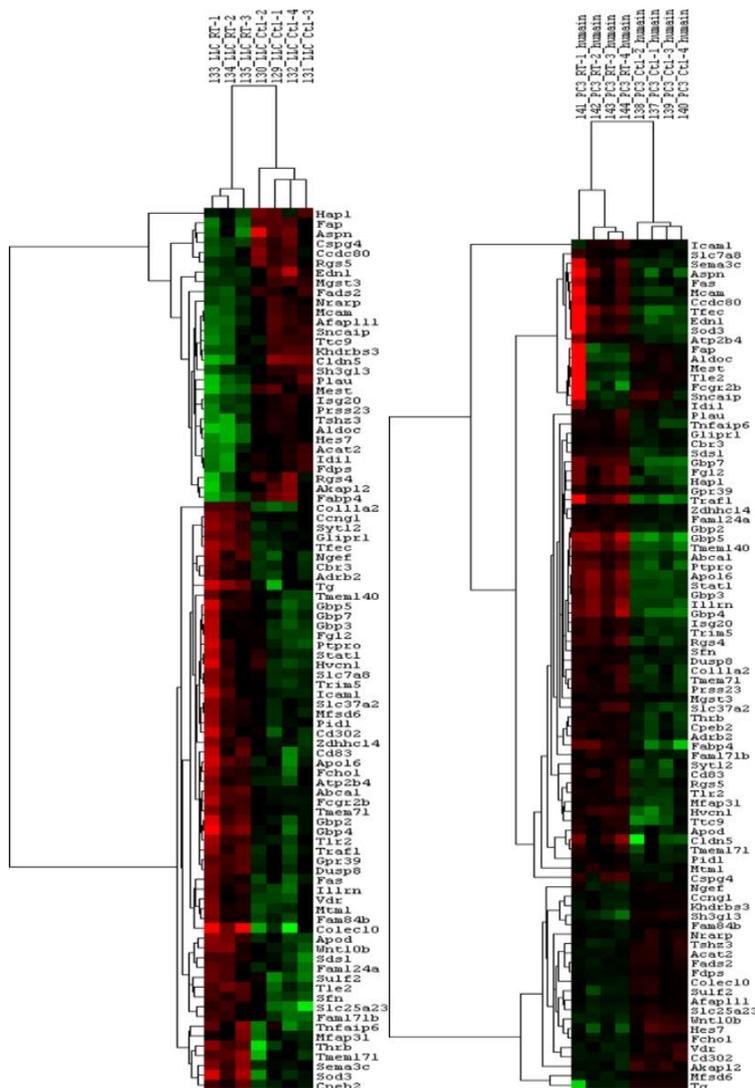
Figure 36 : Etude transcriptomique

Détermination et classification des ARNm du microenvironnement modifiés après radiothérapie de manière commune dans les lignées PC3 et LLC.

(A) : Totalité des gènes concernés répartis en heatmap

(B). Classement des gènes par voie de signalisation

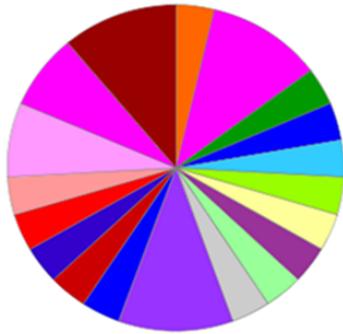
(C) Classement par processus biologique



PANTHER Pathway

Total # Genes: 98 Total # pathway hits: 27

B

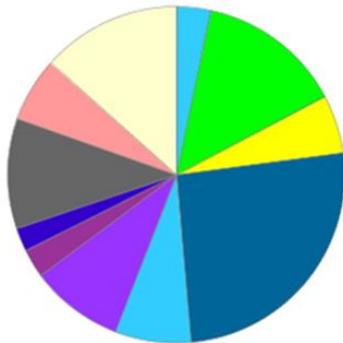


- Angiogenesis (P00005)
- Apoptosis signaling pathway (P00006)
- Cadherin signaling pathway (P00012)
- De novo purine biosynthesis (P02738)
- EGF receptor signaling pathway (P00018)
- Endothelin signaling pathway (P00019)
- FAS signaling pathway (P00020)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway (P00027)
- Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)
- Interferon-gamma signaling pathway (P00035)
- Interleukin signaling pathway (P00036)
- JAK/STAT signaling pathway (P00038)
- Oxidative stress response (P00046)
- PDGF signaling pathway (P00047)
- Ras Pathway (P04393)
- T cell activation (P00053)
- Wnt signaling pathway (P00057)
- p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
- p53 pathway (P00059)

PANTHER GO-Slim Biological Process

Total # Genes: 98 Total # process hits: 179

C



- biological adhesion (GO:0022610)
- biological regulation (GO:0065007)
- cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)
- cellular process (GO:0009987)
- developmental process (GO:0032502)
- immune system process (GO:0002376)
- localization (GO:0051179)
- locomotion (GO:0040011)
- metabolic process (GO:0008152)
- multicellular organismal process (GO:0032501)
- response to stimulus (GO:0050896)

Discussion Générale

Ce travail de thèse souligne que l'effet antitumoral de la radiothérapie ne passe pas uniquement par les cellules cancéreuses. Au cours d'une radiothérapie fractionnée, la vascularisation tumorale subit des transformations structurelles et fonctionnelles qui influencent l'efficacité des traitements systémiques, mais aussi de la radiothérapie elle-même. Nous avons ici montré que, contrairement à l'administration d'une dose unique, la radiothérapie fractionnée induisait une augmentation de la couverture péricytaire des microvaisseaux permettant d'améliorer la distribution et l'efficacité de la doxorubicine administrée de façon concomitante. Néanmoins, une trop forte dose par fraction peut aboutir à une destruction de l'endothélium et une réduction transitoire de la densité microvasculaire. De plus, nos résultats suggèrent que si les modifications structurelles des vaisseaux contribuent à réduire l'hypoxie, l'effet de la radiothérapie sur les cellules tumorales elles-mêmes est également source de modifications de la perfusion et du microenvironnement hypoxique. Ainsi, le taux d'hypoxie locale dépend à la fois de la fonctionnalité des vaisseaux et de l'efficacité antitumorale de l'irradiation, qui elle-même dépend de la sensibilité des cellules tumorales à la dose, au fractionnement et à l'étalement.

1. DENSITE MICROVASCULAIRE ET MORT RADIO-INDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES

Nous avons appliqué différents schémas de radiothérapie, normo et hypofractionnés, sur un modèle de cancer de prostate et un modèle de cancer du poumon. L'étalement était de deux semaines et le prélèvement tumoral avait lieu au moment théorique de la séance suivante d'irradiation, le lundi de la semaine suivante.

1.1. MORT CELLULAIRE ENDOTHELIALE

La densité microvasculaire dans les tumeurs était comparable après tous les schémas de fractionnement. Néanmoins, pour les schémas les plus hypofractionnés, nous avons observé une réduction de l'hypoxie importante dans le modèle PC3 mais pas dans le modèle LLC. Ces schémas présentant un étalement inter-fraction plus long (7 jours entre la dernière fraction et le prélèvement, versus 3 pour les schémas de 2 et 4 Gy par fraction), l'hypothèse d'une cinétique différente des modifications vasculaires entre les deux modèles a été soulevée et testée. Nous avons reproduit sur le modèle LLC le schéma le plus hypofractionné (2 x 12 Gy) et réalisé des analyses intermédiaires 1 et 3 jours après la dernière fraction. Ces analyses ont montré une diminution modérée de la densité microvasculaire avec un nadir au 3ème jour, pour retrouver un niveau plus élevé mais très hétérogène au 7ème jour. De plus, lors de l'expérience indépendante visant à reporter l'impact du remodelage vasculaire sur la distribution de doxorubicine, la densité microvasculaire des tumeurs LLC (irradiées selon le même schéma de 2 x 12 Gy) était significativement plus basse lors du prélèvement à 7 jours, là aussi de façon très hétérogène, suggérant que la vitesse de retour à une densité vasculaire élevée peut varier selon la cinétique individuelle de croissance.

Aucune donnée des expériences précédentes ne confirme ou n'infirme la survenue d'une vague de mort endothéliale. Dans les modèles étudiés ici, il est possible que les cellules tumorales protègent, via des mécanismes qui leurs sont propres, les cellules endothéliales des dommages radio-induits. Il est également possible qu'une vague de mort endothéliale soit compensée par le renouvellement ou la différenciation de cellules stromales en cellules endothéliales exprimant le CD31.

Lorsque nous avons cherché à comprendre l'effet d'une monodose croissante sur les cellules endothéliales, dans une tumeur in vivo, nous avons remarqué que la proportion de cellules TUNEL-positives croît avec la dose délivrée pour les cellules endothéliales comme pour l'ensemble des cellules mais curieusement, cette tendance s'inverse au-delà des 8 à 12 Gy, avec un nombre inférieur de cellules TUNEL-positives à 20 Gy. Cette tendance, bien que remarquable dans les deux modèles tumoraux, est difficilement explicable et les hypothèses quant à son origine sont variées. Nous avons considéré ces résultats comme non concluants. En effet, il est peu probable que la mort cellulaire réellement induite par l'irradiation soit moins importante après 20 Gy. Ces chiffres inattendus peuvent avoir différentes explications.

La méthode de marquage TUNEL ou TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling permet la reconnaissance in situ des extrémités 3'-OH de l'ADN clivé. Elle a initialement été décrite comme sélective de la mort cellulaire programmée (126). D'autres mécanismes plus nuancés de mort cellulaire incluant un clivage de l'ADN, comme la nécroptose ou l'autophagie, ont néanmoins été décrits depuis (127). La mort cellulaire radio-induite inclut différents mécanismes variés tels que l'apoptose, la nécrose, la mort mitotique, l'autophagie, la nécroptose (128,129). Cette pluralité de types de mort varie selon le tissu irradié, le type cellulaire, les circonstances de dose et de temps, et rend impossible un marquage spécifique de la mort cellulaire radio-induite. De plus, le délai de survenue de la mort cellulaire radio-induite peut aller d'un temps très court à plusieurs heures, voire jours pour la mort mitotique, ce qui rend l'effet d'une seule fraction difficile à évaluer à l'échelle d'un tissu. Théoriquement, la majorité des cassures de l'ADN réparables sont corrigées au bout de 4 heures. Ce délai évite donc le biais de détection de lésions non létales. Néanmoins, les lésions complexes et l'accumulation de lésions non létales peut allonger le temps de réparation (130). Un nombre plus élevé de lésions complexes combiné à une part plus importante de nécrose pourrait expliquer le moindre marquage TUNEL pour les fortes doses de 12 ou 20 Gy. Une autre piste moins probable mais non négligeable serait l'activation pour les fortes doses par fraction d'une exonucléase dégradant les extrémités libres de l'ADN double brin clivé (131), rendant leur détection plus difficile.

1.2. IMPACT DU FRACTIONNEMENT SUR L'ENDOTHELIUM

Dans notre modèle d'irradiation fractionnée, la diminution de densité microvasculaire commence à 24 heures et atteint son maximum à 72 heures, suggérant plutôt une mort des cellules endothéliales tumorales par accumulation des lésions radio-induites que par apoptose immédiate. Après une irradiation de 12 Gy dans un modèle de neuroblastome, Jani et al. décrit une baisse transitoire de l'expression de l'endomucine par les cellules endothéliales dès 6 heures, mais une réduction de la densité microvasculaire seulement 72 heures plus tard, suggérant un double phénomène d'apoptose endothéliale précoce et de mort endothéliale plus tardive avec déconstruction des vaisseaux (72).

Dans ces conditions, l'étalement inter-fraction pourrait avoir ici un impact considérable sur les vaisseaux, en permettant ou en limitant la capacité de compensation par repopulation

endothéliale. Ainsi, nous n'avons pas observé de modification de la densité microvasculaire après une irradiation fractionnée de 4 Gy 3 fois par semaine, mais Chen et al. relate une réduction significative et durable de celle-ci après une irradiation quotidienne aux mêmes doses sur des tumeurs de prostate TRAMPC1 (79). Similairement, Frenzel et al. relate une diminution forte et durable de la densité microvasculaire, toujours observable 8 jours après une irradiation quotidienne de 10 Gy pendant 5 jours (87).

Plusieurs études montrent qu'en l'absence de répétition de l'irradiation, la mort endothéliale radio-induite conduit à plus long terme à une augmentation de la densité microvasculaire « réactionnelle » à l'augmentation hypoxique transitoire. Les travaux étudiant parallèlement la cinétique de la densité microvasculaire et de l'hypoxie montrent une accélération de l'angiogenèse tumorale suite à l'augmentation transitoire de l'hypoxie. Ainsi, après une monodose de 15 Gy sur des tumeurs LLC ou de 20 Gy sur des fibrosarcomes FSall, le sursaut hypoxique survenant 48 à 72 heures après l'irradiation est suivi d'une augmentation franche et durable de la densité microvasculaire, qui était stable dans les suites immédiates de l'irradiation (68,75). Les travaux de Lan, comparant l'administration de 12 Gy en monodose ou en répétition hebdomadaire sur des tumeurs LLC, confirment le lien entre hypoxie et densité microvasculaire (71). Alors que la densité microvasculaire des tumeurs non irradiées augmente de façon constante, elle reste stable quelques jours après une monodose mais rattrape le niveau du groupe contrôle de façon accélérée en 7 jours. A l'inverse après 3 séances hebdomadaire de 12 Gy, la densité microvasculaire est stable dans un premier temps puis diminue progressivement et durablement, 8 jours après la dernière séance, faisant suite à la réduction de l'hypoxie tumorale. Cette cinétique correspond plutôt à une baisse de la stimulation angiogénique par la levée de l'hypoxie qu'à une apoptose endothéliale massive.

2. REPONSE DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE A LA RADIOTHERAPIE FRACTIONNEE

2.1. CONTRIBUTION DU COMPARTIMENT ENDOTHELIAL A L'AMELIORATION DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE

Nos résultats ne montrent pas d'augmentation de la densité vasculaire et même, dans certains cas, relatent une réduction transitoire de celle-ci. En parallèle pourtant, le niveau d'hypoxie est réduit, proportionnellement à la dose par fraction dans le modèle PC3. Certaines modifications radio-induites du compartiment vasculaire, indépendantes de la densité microvasculaire, peuvent être en jeu dans la réduction de la surface hypoxique.

Il a récemment été montré que l'irradiation pouvait restaurer l'activité de eNOS et réprimer son inhibiteur Caveolin 1 dans les cellules endothéliales tumorales, permettant d'améliorer la perfusion sanguine, de réduire l'hypoxie et d'améliorer ponctuellement la régulation du flux sanguin (132). Par ailleurs, la restauration radio-induite de la couverture péricytaire peut également favoriser la réponse contractile à l'influx de NO.

Nous pouvons soulever l'hypothèse que la restauration de eNOS radio-induite combinée à l'augmentation de la couverture péricytaire peut expliquer en partie la réduction radio-induite de la fraction tumorale hypoxique. Cependant elle ne peut être que partiellement expliquée par ces mécanismes. Contrairement aux changements observés ici, la restauration de eNOS

n'a pas été démontrée comme dose-dépendante, et nos travaux montrent une restauration de la couverture péricytaire similaire quel que soit le schéma de fractionnement. Nous avons constaté clairement que le niveau d'amélioration de l'hypoxie et de la perfusion était différent d'un schéma à un autre, et quantitativement lié à la dose par fraction. De même, aucune modification morphologique du réseau vasculaire pouvant évoquer une hiérarchisation artérioveineuse n'a été observée (80). Il est donc notoire que le compartiment vasculaire n'est pas responsable à lui seul des modifications d'oxygénation tumorale. Les composantes tumorales extravasculaires contribuent par différents aspects à l'apport et à la consommation d'oxygène, et sont également impactées par l'irradiation et le schéma de fractionnement.

2.2. CONTRIBUTION DES COMPARTIMENTS EXTRAVASCULAIRES A L'AMELIORATION DU MICROENVIRONNEMENT HYPOXIQUE

2.2.1. Impact de l'irradiation fractionnée sur les composantes extravasculaires de l'hypoxie

L'hypoxie est la résultante d'un déséquilibre plus ou moins important entre l'apport et la consommation d'oxygène. Dans les travaux présentés ici, l'impact du fractionnement sur l'hypoxie et la perfusion tumorales est différent dans les 2 modèles. Bien que représentant tous deux des cancers solides traités de façon courante par radiothérapie hypofractionnée, ces modèles présentent des propriétés différentes, telles que leur vitesse de prolifération, leur radiosensibilité intrinsèque, leur métabolisme cellulaire, qui modifient l'équilibre apport /consommation et sont à l'origine de réponses divergentes à la radiothérapie fractionnée.

Les cellules tumorales PC3 proliféraient à une vitesse modérée et aboutissaient à la création de tumeurs denses mais peu hypoxiques. Leur ratio α/β était relativement faible (2.1), les rendant particulièrement sensibles à l'augmentation de dose par fraction. De façon concordante, les schémas à forte dose par fraction aboutissaient à une réduction du volume tumoral et une reprise de croissance tardive en comparaison au schéma standard, qui aboutissait plutôt à une stabilisation du volume tumoral. Dans les tumeurs PC3, l'hypoxie sévère mesurée après 2 semaines de radiothérapie était réduite dans une proportion différente et proportionnelle à la BED pour chaque schéma de fractionnement. La perfusion, mesurée par l'intégration nucléaire du Hoechst 33342, était augmentée de façon proportionnelle à la BED. Les tumeurs LLC proliféraient très rapidement, aboutissant à la formation de tumeurs de densité hétérogène, présentant une densité microvasculaire élevée mais aussi de larges et multiples zones d'hypoxie sévère. Leur ratio α/β était modérément élevé (8.2), témoignant d'une capacité de réparation élevée et une sensibilité modérée à l'augmentation de dose par fraction. A défaut d'aboutir à une réduction du volume tumoral, les schémas les plus hypofractionnés permettaient un ralentissement de la croissance tumorale supérieur au schéma standard, le schéma 2 x 12 Gy semblant se détacher légèrement, sans qu'on puisse conclure avec certitude du fait de la rapidité d'atteinte du volume critique. Dans les tumeurs LLC, l'hypoxie sévère n'était pas modifiée dans le schéma standard, légèrement réduite dans les schémas hypofractionnés. Cependant, contrairement au modèle PC3 où la réduction de l'hypoxie persiste 7 jours après 3 x 8 Gy ou 2 x 12 Gy, la durée de l'amélioration est limitée à 3 jours dans ce modèle. La perfusion de Hoechst 33342 n'était modifiée que dans le schéma 2 x 12 Gy, où elle était transitoirement augmentée à J3.

2.2.2. Impact de l'irradiation fractionnée sur la repopulation, et les contraintes physiques

En maintenant une pression répétée sur la prolifération tumorale, la radiothérapie fractionnée a un impact direct sur le stress solide (133). L'augmentation de la dose par fraction et la mort simultanée d'un plus grand nombre de cellules induit logiquement une réduction de la consommation d'oxygène et de nutriments, proportionnelle à la radiosensibilité immédiate du modèle cellulaire. En cohérence avec nos résultats, Kane et al a montré sur des tumeurs LLC qu'une radiothérapie normofractionnée de deux semaines permettait d'obtenir un ralentissement de la vitesse de croissance sans que la proportion de cellules cyclantes, marquées par le Ki67, soit réduite (81). Soit un simple ralentissement du cycle cellulaire, ne permettant pas de réduire le stress solide ni l'hypoxie, similairement aux résultats obtenus dans notre modèle. D'autres travaux utilisant un modèle sous-cutané de tumeur colique ne retrouvent une baisse détectable de la pression interstitielle que pour des doses de 5 Gy ou supérieures, avec un effet dose-dépendant (134). A la lumière de ces résultats, la radiosensibilité des cellules cancéreuses au sens radiobiologique propre, c'est-à-dire impliquant l'arrêt de prolifération définitif, est un facteur déterminant important du stress solide et du taux d'hypoxie locale. Le maintien d'une dose par fraction efficace, mais plus encore d'un étalement inter-fraction adapté à la vitesse de prolifération, apparaît fondamental pour obtenir une réponse durable à la radiothérapie et aux traitements concomitants.

2.2.3. Impact de l'irradiation fractionnée sur le métabolisme et la mort cellulaire tumorale

Dans notre modèle PC3, il n'y avait pas de réduction mais une stabilisation du volume tumoral pour le schéma standard, et une réduction du volume tumoral observable seulement à partir de la deuxième semaine d'irradiation, d'autant plus précoce que la dose par fraction est élevée. En revanche, la diminution puis reprise de croissance des groupes irradiés à 8 et 12 Gy par séance semblait approximativement superposable, suggérant un effet « seuil ».

Dans les modèles de tumeurs pulmonaires, la mort cellulaire n'est observable que pour des doses d'irradiation plus élevées. Malgré une prolifération qui reste soutenue après 10 x 2 Gy dans des tumeurs LLC, un ralentissement des mitoses marquées par le phosphohistone H3 (H3P) a été décrit. Néanmoins, cet arrêt partiel du cycle cellulaire n'était pas suffisant pour induire une réduction de l'hypoxie dans les tumeurs (81). En revanche, pour des doses par fraction de 10 Gy ou supérieures, une nette vague de mort cellulaire impliquant des mécanismes différents a été décrite. Ainsi, la mort cellulaire par nécroptose, assimilable à une nécrose programmée, pouvait doubler l'impact d'une monodose de 10 Gy, et prendre des proportions plus importantes encore avec l'accroissement de la dose. L'inhibition de la nécroptose par extinction de l'expression de RIP3 rétablissait une radiorésistance cohérente avec le modèle linéaire-quadratique (73). Dans notre modèle, lors de la comparaison des courbes de survie des différents fractionnements sur le modèle LLC, bien que la vitesse d'atteinte du volume limite soit trop rapide pour déceler une différence significative, le schéma 2 x 12 Gy semblait se détacher des autres schémas hypofractionnés (tendance, $p=0.09$), pouvant être compatible avec cette hypothèse et avec une réduction de l'hypoxie plus importante pour ce schéma.

2.3. CONTRIBUTION RELATIVE DES COMPOSANTES DU MICROENVIRONNEMENT A L'AMELIORATION DE L'HYPOXIE

Le cancer ne peut être réduit à un amas de cellules transformées indépendantes et invasives en dépit du microenvironnement. La radiothérapie et le schéma de fractionnement ont des conséquences différentes pour chaque composante tumorale et microenvironnementale (cellules tumorales, endothéliales, stromales, matrice extracellulaire...), dont la sensibilité au stress oxydant, le métabolisme, la prolifération ou la mort cellulaire diffèrent à la fois entre eux et selon les circonstances. Lyng et al ont cherché à évaluer et hiérarchiser l'impact sur l'hypoxie de la densité microvasculaire, l'apoptose, la mitose, la densité cellulaire de tumeurs du col de l'utérus en cours de radiothérapie normofractionnée (schéma standard de 50 Gy, biopsies réalisées sur les patientes après 10 séances de 2 Gy). Sur l'ensemble des patientes et des données recueillies, le seul paramètre ayant montré un lien significatif avec la réoxygénation tumorale était la réduction de la densité cellulaire. Les tumeurs les mieux réoxygénées et de plus faible densité cellulaire avaient en revanche un taux de mitose plus important, expliqué par les auteurs par l'absence d'inhibition de contact. Dans cette étude, les changements de densité microvasculaire n'ont pas montré d'impact sur la réoxygénation, et les auteurs en déduisent que la compression vasculaire et le stress solide sont plus influents sur la perfusion que la quantité de vaisseaux (135). Bien que bien menée et tout à fait pertinente, ce travail ne prend pas en compte les péricytes et l'existence éventuelle d'une normalisation vasculaire, ni les modifications métaboliques, et leur part dans la réoxygénation reste à définir.

2.4. CINETIQUE DE REOXYGENATION

La mesure de l'hypoxie sévère et de la perfusion était réalisée 3 jours après la dernière séance pour les schémas utilisant 2 et 4 Gy par séance, et 7 jours après pour les schémas à 8 et 12 Gy par séance, afin d'homogénéiser l'étalement et de correspondre à la date de réalisation de la séance suivante. Si cette planification n'a pas eu d'impact sur l'interprétation des résultats du modèle PC3, elle a soulevé pour le modèle LLC une problématique de comparabilité entre les schémas à faible et fort hypofractionnement. Aussi, pour expliquer la divergence du taux d'hypoxie après les fortes doses par fraction, l'expérience a été renouvelée et le microenvironnement hypoxique des tumeurs LLC analysé au 3^{ème} jour après la dernière séance de 12 Gy, similairement aux analyses recueillies pour les schémas de fractionnement standard et 6 x 4Gy. L'analyse « cinétique » a montré une amélioration de la perfusion dans les 3 jours suivant la dernière séance, mais compensée au 7^{ème} jour (J14) probablement du fait de la réélévation rapide du stress solide compressif lié la prolifération tumorale. L'hypoxie était stabilisée pendant 3 jours (jusqu'à j9) avant de remonter à J14. Néanmoins, l'amélioration franche mais transitoire de la perfusion suggère qu'un délai inter fraction plus court aurait pu permettre une stabilisation plus durable de l'hypoxie.

Les travaux de Lan et al, portant également sur des tumeurs LLC, décrivent après une séance unique de 12 Gy un ralentissement de l'augmentation de l'hypoxie d'une durée de 3 jours, rapidement compensé ensuite. L'administration de cette même dose répétée tous les 7 jours pendant 3 semaines permet une stabilisation plus durable de l'hypoxie, se maintenant jusqu'à 7 jours après la dernière séance (71). La baisse de la densité microvasculaire observée environ 48 heures après la réduction de l'hypoxie, est expliquée par les auteurs

plutôt comme une baisse de la stimulation angiogénique consécutive à la baisse du niveau d'hypoxie, que considérée comme la cause.

De façon comparable, l'administration quotidienne de 7 à 13 Gy pendant 1 semaine sur un modèle de tumeur ORL (FaDu) montrait une amélioration de l'oxygénation tumorale croissante avec la dose par fraction. La durée de la réoxygénation obtenue était d'autant plus longue que l'amélioration était importante, et était significativement corrélée à une repousse plus tardive des tumeurs (86). Les travaux de Yaromina et al, sur 6 lignées tumorales, montrent que les lignées présentant les temps de doublement les plus courts bénéficient moins de la réoxygénation induite par une irradiation normofractionnée, soulignant encore l'importance de la densité cellulaire et de la prolifération tumorale dans la cinétique de réoxygénation tumorale (83).

Crokart et al a réalisé une étude plus fine de la cinétique de réoxygénation, sur un modèle de fibrosarcome (FSall) et un modèle d'hépatocarcinome (TLT). Elle met en évidence une réoxygénation en deux étapes. Premièrement, une phase de réoxygénation précoce liée à la combinaison d'un phénomène d'inflammation locale augmentant le volume de l'apport sanguin, et de l'arrêt du cycle cellulaire lié aux lésions de l'ADN. Cette première phase apparaissait 3 à 4 heures après l'irradiation, et la réoxygénation pouvait être maintenue en renouvelant l'irradiation avant sa régression. Ensuite, une phase de réoxygénation plus tardive, débutant au moins 24 heures après l'irradiation, et plus durable, décrite comme liée à la réactivation d'eNOS (64). Des travaux plus récents relatant la mesure en temps réel de l'oxygénation de tumeurs LLC par sonde oxymétrique montrent également, après une séance unique de 15 Gy, une première vague de réoxygénation atteignant son pic au bout de 6 heures puis régressant, suivie d'une seconde vague plus lente et plus tardive s'étalant entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jour (68). Bien que décrite par ses auteurs comme la conséquence d'une destruction vasculaire réversible, cette cinétique semble corroborer avec l'hypothèse de Crokart, d'autant que le niveau d'expression du marqueur vasculaire CD31 est décrit comme stable.

Chez l'homme, la seule étude clinique disposant d'une évaluation cinétique de l'hypoxie en cours de radiothérapie hypofractionnée concerne 3 patients traités pour une tumeur bronchique non à petite cellules selon un schéma de 3 x 18 Gy (136). L'évaluation par TEP au F-misonidazole montre une légère augmentation de l'hypoxie 48 heures après la première séance, suivie d'une régression ou une stabilisation après 4 jours variable selon les patients. Les faibles effectifs et la méthodologie ne permettent cependant ni de faire le parallèle avec les résultats précliniques, ni d'extrapoler à la pratique clinique courante.

3. *PROGRES DANS LA CARACTERISATION DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO INDUIT*

3.1. *Concept de normalisation vasculaire radio-induite*

Les conséquences de la normalisation vasculaire, dans le cadre de son induction par les anti angiogéniques, ont été largement décrites ces 15 dernières années. L'amélioration de la couverture péricytaire et de la perméabilité vasculaires sont des atouts pour la distribution de drogues concomitantes, et les recommandations cliniques actuelles incluent des stratégies de normalisation vasculaire chimio-induites dans de nombreux contextes (21). La normalisation vasculaire induite par l'irradiation reste peu documentée.

Les travaux présentés ici font suite aux travaux précédents de l'équipe, constatant un remodelage vasculaire conséquent à la radiothérapie normofractionnée, s'apparentant à la normalisation vasculaire. Ces travaux montraient une amélioration de la couverture péricytaire, un plus grand nombre de jonctions serrées, ainsi qu'une amélioration de l'hypoxie tumorale (sans régression du volume moyen des tumeurs) (80). En parallèle, d'autres équipes ont montré une augmentation de la VE-Cadhérine et des intégrines de surface suite à l'irradiation de cellules endothéliales *in vitro* (137,138) ainsi qu'une augmentation de la couverture péricytaire après irradiation hypofractionnés dans le modèle LLC *in vivo* (71). Les rares études quantifiant la couverture péricytaire après irradiation en monodose sont quant à elles discordantes et hétérogènes dans leurs résultats (72,73). Nous avons ici cherché à explorer de façon plus profonde le remodelage vasculaire radio-induit en le confirmant dans le modèle LLC et en étudiant l'influence du schéma de fractionnement sur la couverture péricytaire. Nous avons pu asseoir le concept de remodelage vasculaire radio-induit en reproduisant l'amélioration de la couverture péricytaire sur 3 modèles tumoraux. De plus, nous avons mis en évidence que ce remodelage vasculaire était indépendant de la dose par fraction sur une large gamme de doses.

3.2. INTERET THERAPEUTIQUE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO INDUIT

Le bénéfice thérapeutique apporté par l'amélioration de la couverture péricytaire n'est pas clair. Le développement parallèle de thérapies anti-angiogéniques, pour certaines ciblant l'interaction endothélium-péricytes, pour d'autres visant à la renforcer, illustre bien l'ambivalence de nos connaissances en la matière. Les agonistes du PDGFR β et les anti VEGFR-2 renforcent l'interaction entre cellules endothéliales et péricytes, limitant la diffusion métastatique et la croissance des cancers digestifs. A l'inverse, les antagonistes du PDGFR β et du VEGF/ VEGFR ciblent l'interaction péricyte-endothélium dans le but d'affaiblir les vaisseaux et aboutir à l'asphyxie de la tumeur par insuffisance d'apports efficaces, mais peuvent aboutir à une accélération de la croissance tumorale dans certaines conditions de dose et de contexte mutationnel (139). L'harmonie des interactions entre les différentes composantes de la vascularisation, aboutissant à la stabilité des membranes et un apport de qualité, paraît comme une fine question d'équilibre.

Nos résultats montrent cependant dans 2 modèles que la normalisation vasculaire s'accompagnait bien d'une amélioration de la distribution et de l'efficacité de la doxorubicine. Ces résultats établissent une preuve du concept que le remodelage vasculaire radio-induit pourrait être mis à profit dans la délivrance de traitements anticancéreux. L'amélioration de la distribution et de l'efficacité de la doxorubicine liposomale concomitante à la radiothérapie a déjà été démontrée chez l'homme (140). Les chimiothérapies sont fréquemment utilisées à visée radiosensibilisante mais les doses sont limitées par la toxicité de l'association. Nos résultats montrent que la radiothérapie améliore l'efficacité de la chimiothérapie de façon prolongée, au moins 3 jours après la fin de l'irradiation. Cela suggère une utilisation de la radiothérapie pour améliorer l'efficacité locale de la chimiothérapie en limitant les toxicités d'une administration concomitante. Une telle stratégie pourrait être testée même sur des tumeurs radiorésistantes, dans le seul but d'améliorer leur chimiosensibilité.

De plus, nos résultats montrent que l'utilisation d'un anti-angiogénique est compatible avec l'irradiation sans augmentation de l'hypoxie. De façon intéressante, une amélioration de l'efficacité du sunitinib après radiothérapie a déjà été montrée, sans que sa distribution

intratumorale ait été investiguée (119). De futurs essais cliniques investiguant les propriétés chimio sensibilisantes de l'irradiation, utilisant au possible des technologies non invasives d'étude du microenvironnement vasculaire, pourraient identifier la chronologie optimale pour l'association avec la chimiothérapie.

3.3. ORIGINE DES PERICYTES TUMORAUX

Les marqueurs exprimés par les péricytes et leur quantité relative dépendent de l'activation et de la maturité des péricytes et peut biaiser leur reconnaissance (10). La desmin est une protéine structurelle des péricytes et des muscles lisses, constamment exprimée mais peu spécifique. α SMA est une protéine structurelle exprimée uniquement par les péricytes activés, plus présents dans le cancer et l'inflammation.

Bien que non statistiquement significative, nos analyses montrent une tendance à l'accroissement de la proportion de péricytes SMA positifs par rapport aux péricytes Desmin-positifs avec la dose par fraction, pouvant témoigner de phénomènes d'activation plus importants avec la dose. L'origine et la signification de ce recrutement péricytaire en cours de radiothérapie est intrigant. De plus en plus d'arguments en faveur d'une origine multiple des péricytes émergent (141). Dans les tumeurs, les péricytes présents, bien qu'immatures et interagissant mal avec l'endothélium, sont des cellules saines et non des cellules tumorales transformées (142). L'excès de VEGF-A au sein des tumeurs solides maintient un état constant d'activation des péricytes, empêchant leur maturation (143). En revanche, le rôle crucial de l'expression du PDGF β par les cellules endothéliales et de son récepteur par les péricytes est consensuel. Dans les tumeurs, le PDGF β est majoritairement exprimé par les cellules cancéreuses et non par cellules endothéliales : la liaison forte nécessaire entre l'endothélium et le péricyte n'est pas suffisamment établie pour obtenir la stabilisation du vaisseau (8).

L'analyse transcriptomique présentée dans ce travail confirme qu'outre les voies de régulation du cycle cellulaire comme p53, Wnt ou RAS, les voies concernant l'angiogenèse, PDGF, EGF ou l'endothélin sont présentes, confirmant l'importance de la réponse vasculaire au sein du microenvironnement. Un autre résultat marquant est la prépondérance des voies de réponse immunitaires spécifiques. Interleukines, cytokines, voies d'activation des lymphocytes T ou encore FAS sont présents en proportion importante. Les microenvironnements immunitaire et vasculaire sont fortement liés par de nombreux processus de régulation, d'adhésion, de migration et de chimiotactisme (144). Les mécanismes du remodelage vasculaire radio induit restent très peu connus, mais la participation du micro-environnement immunitaire au recrutement des péricytes et aux remaniements endothéliaux est une hypothèse qui, au vu des résultats précédents, est tout à fait vraisemblable.

3.4. ROLE DES PERICYTES DANS LA NORMALISATION ET LA DISTRIBUTION D'AGENTS ANTICANCEREUX

La nature des péricytes tumoraux n'est pas entièrement superposable à celle des péricytes régulateurs de l'angiogenèse physiologique et le concept de « normalisation vasculaire » dans ce contexte reste un terme abusif. L'équipe de Kim et al fait état de péricytes

dédifférenciés, exprimant PDGFR β mais n'exprimant pas la desmin, dans des tumeurs mammaires. L'absence d'expression de la desmin dans les péricytes tumoraux était associée à une mauvaise réponse aux anthracyclines et une plus grande agressivité tumorale (13). A l'inverse, en contexte de traitement anti-angiogénique ou, comme dans ces travaux, de radiothérapie fractionnée, les péricytes pourraient se différencier et devenir eux-mêmes les orchestrateurs et régulateurs de la normalisation vasculaire (145).

L'hypothèse d'une levée d'hypoxie qui favoriserait la migration des péricytes et leur lien avec les cellules endothéliales paraît peu vraisemblable, compte-tenu de la faiblesse de la réduction de l'hypoxie dans les tumeurs LLC. La constance du remodelage quel que soit le schéma de fractionnement et le modèle tumoral peut faire supposer un mécanisme moléculaire radio-induit dès les faibles doses, plus probablement au sein des cellules du microenvironnement. Les séquençages transcriptomiques soulèvent plusieurs candidats potentiels sans qu'une voie spécifique ne se dégage clairement.

4. AUTRES MODIFICATIONS RADIO-INDUITES POUVANT INFLUENCER LA DISTRIBUTION D'AGENTS ANTICANCEREUX

Dans les conditions de fractionnement que nous avons étudiées ici, la radiothérapie fractionnée allait en faveur de la distribution de doxorubicine. Cet effet est attribuable en grande partie à la normalisation vasculaire radio-induite décrite dans le chapitre précédent. D'autres modifications d'ordre différent ont lieu lors d'une radiothérapie fractionnée, et peuvent également contribuer à l'accès et l'efficacité des traitements.

De façon intuitive et démontrée, la simple décompression mécanique permet une meilleure distribution de la chimiothérapie dans la tumeur, tout comme elle permet de réduire l'hypoxie (106). L'équipe de Jain a étudié *in silico* la participation relative du stress solide et de la normalisation vasculaire à la diffusion intratumorale de chimiothérapie. Les simulations informatiques ont montré que l'effet de la levée de compression mécanique est limité dans un contexte d'hyperperméabilité vasculaire. A l'inverse, la normalisation vasculaire seule ne permettait l'amélioration de la distribution de chimiothérapie qu'en l'absence de stress compressif (22). La conclusion des auteurs est que la solution optimale est de combiner normalisation vasculaire et décompression mécanique, par la combinaison d'agents anti-angiogéniques et le ciblage de la matrice extracellulaire, par exemple. Nos résultats montrent que la radiothérapie hypofractionnée, dans des conditions d'étalement adaptées à la vitesse de repopulation tumorale, peut remplir à elle seule ces deux critères. De façon plus poussée, des stratégies associant les anti-angiogéniques, dans une chronologie et des doses contrôlées, à la radiothérapie, ont été proposées. L'idée est d'abord de profiter de la « fenêtre de normalisation » des anti-angiogéniques pour optimiser l'efficacité de la radiothérapie dès la première séance, par effet oxygène, ce qui permet alors une décompression mécanique rapide et d'entretenir la normalisation vasculaire par la radiothérapie fractionnée (93,146).

Une revue exhaustive récente liste l'ensemble des facteurs tumoraux ayant montré une influence sur la distribution d'une drogue (19). Les facteurs relevés étaient la densité microvasculaire, la perméabilité des vaisseaux, la pression tissulaire et interstitielle, mais également la densité de matrice extracellulaire et l'existence de shunts artérioveineux. La plupart de ces facteurs sont modifiés par la radiothérapie. Néanmoins, si l'impact de la radiothérapie fractionnée sur la pression tissulaire et interstitielle est clairement favorable, la

baisse de la densité microvasculaire induite par les fortes doses par fraction peut aller à l'encontre de la distribution de chimiothérapie. De même, l'hyperperméabilité vasculaire transitoire peut modifier la distribution d'une drogue administrée dans les quelques heures suivant une séance d'irradiation, même si le remodelage vasculaire limite à plus long terme l'effet de fuite. De plus, l'inflammation radio-induite serait plutôt favorable à une augmentation de la densité de matrice extracellulaire.

Un critère plus surprenant mis en exergue dans la revue de Dewhirst et Secomb, était l'existence de shunt artérioveineux. Pour atteindre l'homéostasie, les vaisseaux normaux s'adaptent de façon permanente aux conditions métaboliques et hémodynamiques locales par le relâchement ou de la contraction des péricytes, permettant une convection et une diffusion sanguine optimales. Les canaux ioniques et gap junctions entre cellules endothéliales et cellules périvasculaires permettent le passage d'information d'amont en aval. Dans les tumeurs, l'absence de hiérarchie du réseau vasculaire limite la diffusion de l'information. En conséquence, le tonus vasculaire est hétérogène et altère la perfusion comme la distribution des traitements systémiques (19). L'impact de la radiothérapie sur les canaux ioniques et la hiérarchisation vasculaire est inconnu mais pourrait constituer une nouvelle voie de recherche intéressante.

Perspectives

1. MODELISATION DE LA REPONSE TUMORALE A LA RADIOTHERAPIE HYPOFRACTIONNEE

Modélisations in silico de la réponse à l'irradiation

La modélisation informatique de la réponse tumorale à l'irradiation est un outil particulièrement prometteur, dans la mesure où il offre la possibilité de s'affranchir (en partie) d'expérimentations *in vitro* et *in vivo*, et d'anticiper certaines difficultés cliniques et matérielles. Le développement de modèles de réponse à différents schémas de fractionnement, dose et étalement fait l'objet de nombreux travaux. A terme, le but des modèles informatiques est de prédire la réponse au traitement à partir des paramètres particuliers de chaque tumeur et de chaque patient pour déterminer et adapter les meilleures options thérapeutiques, et en l'occurrence le meilleur schéma de fractionnement de l'irradiation.

Comme nous l'avons vu, le modèle linéaire quadratique est jusqu'ici l'un des meilleurs et des plus pratiques pour simuler la mort radio-induite des cellules tumorales. Il n'est néanmoins pas suffisant seul : la prise en compte du microenvironnement tumoral est nécessaire, celui-ci ayant des conséquences directes sur la radiosensibilité tumorale.

Plusieurs modèles prenant en compte l'hypoxie tumorale se développent. La plupart extrapolent l'hypoxie à partir d'une densité microvasculaire théorique (147). D'autres modèles récents prennent même la repopulation en compte, qui peut être accélérée en cas de réoxygénation (148). Néanmoins, la prise en compte du stress solide, de la résistance des parois vasculaires à la compression, de l'existence ou non d'une couverture péricytaire et d'un remodelage vasculaire radio-induit, reste un enjeu pour les années à venir. Une meilleure connaissance de l'évolution dynamique des différents paramètres microenvironnementaux en cours d'irradiation fractionnée permettrait d'améliorer la précision et la justesse des modèles existants.

Etude non invasive du microenvironnement vasculaire et hypoxique

Les données obtenues par l'échographie de contraste ne se sont pas montrées concordantes avec les données histologiques. Plusieurs méthodes de détection de l'hypoxie et de la perfusion tumorale sont en cours d'évaluation préclinique et clinique, dont la principale limite reste la faible résolution spatiale (149). Un projet issu de ce travail serait de déterminer la meilleure méthode non invasive pour évaluer la présence de vaisseaux et leur qualité, la perfusion et l'hypoxie tumorales en cours d'irradiation.

Les pistes les plus avancées sont l'IRM fonctionnelle de contraste ou de diffusion, certains agents de contraste ou encore la TEP au F-misonidazole, mais elles doivent encore être améliorées avant d'être utilisées en routine clinique (150–155). L'analyse de texture des images scanner pourrait être une solution plus aisée, permettant l'exploitation des images de

repositionnement réalisées en cours de radiothérapie, mais là aussi la résolution spatiale est un facteur limitant (156,157).

2. ROLE DES PERICYTES DANS LA REPONSE A L'IRRADIATION

Le remodelage vasculaire radio-induit a été bien défini dans nos travaux mais le rôle des péricytes dans la réduction de l'hypoxie reste mal défini. Leurs voies de recrutement sont toujours des hypothèses. Nos résultats montrant un remodelage vasculaire indépendant de la dose par fraction n'expliquant pas à eux seuls la réduction dose-dépendante de l'hypoxie.

Les travaux de l'équipe de LeBleu et Cooke étudient l'impact de la déplétion péricytaire sur la progression tumorale et la diffusion métastatique. Leurs résultats ont montré que la déplétion péricytaire par invalidation du PDGFR β majorait l'hypoxie tumorale (15).

Pour les travaux à venir, les questions suivantes se posent :

- Par quelle voie le recrutement des péricytes a-t-il lieu lors du remodelage vasculaire radio-induit ? L'invalidation du PDGFR β aurait-elle un impact sur le remodelage vasculaire radio-induit ?
- Dans quelle mesure les péricytes participent-ils à la réoxygénation tumorale lors de l'irradiation fractionnée ?

Dans le but de répondre à ces questions, l'utilisation de souris PDGFR β -invalidées est envisagée, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr LeBleu.(Harvard Medical School, Boston, USA). Leur modèle animal est particulièrement intéressant dans cette optique : ces souris BALB/c transgéniques expriment la thymidine kinase d'Herpes Simplex 1 sous le contrôle du promoteur du PDGFR β . Ainsi, l'administration aux souris de ganciclovir (antiviral, *per os*) permet de détruire spécifiquement les cellules exprimant la thymidine kinase, donc le PDGFR β . Ainsi, l'invalidation inductible et contrôlée des péricytes permettra d'évaluer leur impact sur la réponse à l'irradiation, l'hypoxie et la perfusion tumorales dans différentes conditions de temps.

3. INFLUENCE DU REMODELAGE VASCULAIRE RADIO-INDUIT SUR L'INFILTRAT IMMUNITAIRE

Les immunothérapies sont des traitements anticancéreux qui ont pour but de générer ou stimuler une immunité spécifique antitumorale. Leur efficacité sur la survie est globalement modeste mais elles ont pour avantage de favoriser des réponses prolongées chez une petite partie des patients (158–160).

L'infiltrat immunitaire tumoral, en particulier la présence de lymphocytes T CD8 effecteurs, est un facteur pronostic crucial dans la réponse à l'immunothérapie (62). Au cours de leur progression, les cellules tumorales installent un microenvironnement immunomodulateur, voir immunosuppresseur, par la sécrétion de cytokines régulatrices de l'infiltrat lymphocytaire et d'inhibiteurs des lymphocytes T spécifiques, limitant ainsi la réaction immunitaire spontanée contre les antigènes tumoraux (161). L'irradiation a de nombreux effets sur l'infiltrat

immunitaire tumoral, tant immunomodulateurs qu'immunostimulateurs, qui entrent en compétition. La radiothérapie associée à l'immunothérapie permet de donner l'avantage aux effets immunostimulateurs de la radiothérapie et de stimuler la réponse spécifique aux antigènes tumoraux, pouvant parfois donner des réponses spectaculaires (162).

Le fractionnement de la radiothérapie a un impact considérable sur l'infiltrat lymphocytaire tumoral et la réponse à l'immunothérapie. Dewan et al a montré que le schéma le plus favorable à un infiltrat cytotoxique efficace était de 8 Gy par séance dans un modèle de tumeur mammaire. Au-delà de 10 Gy, l'avantage semble décroître. Pour les schémas de fractionnement standard, les modifications de l'infiltrat immunitaire semblent majoritairement négligeables, mais certaines études relatent des remaniements macrophagiques aux conséquences importantes dès 2 Gy (65).

Les vaisseaux sont des acteurs importants pour la transmigration des cellules immunitaires dans les tumeurs (144) et pour l'acheminement des immunothérapies, comme des autres traitements systémiques, vers la tumeur. Il a été montré que la normalisation vasculaire induite par les anti-angiogéniques pouvait augmenter l'infiltrat de lymphocytes T effecteurs et limiter le recrutement tumoral de cellules immunorégulatrices, permettant d'améliorer l'efficacité des immunothérapies anticancéreuses (44). Un objectif de recherche à venir est de déterminer l'impact du remodelage vasculaire sur la distribution et l'efficacité des immunothérapies, et de comprendre l'influence des modifications hypoxiques qui peuvent être induites par différents fractionnements sur l'infiltrat immunitaire.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier l'influence de la radiothérapie fractionnée sur le microenvironnement vasculaire tumoral, en se focalisant d'une part sur les vaisseaux à proprement parler, leur morphologie et leur capacité à délivrer un traitement systémique, d'autre part sur les aspects plus composites que sont l'hypoxie et la perfusion sanguines.

Si le remodelage vasculaire radio-induit avait déjà été décrit dans différentes études de radiothérapie fractionnée, ce travail apporte une information claire et nouvelle sur son caractère indépendant de la dose par fraction, reproductible dans 2 modèles fondamentalement différents. Cette connaissance est utile et profitable notamment pour la compréhension et la planification de schémas thérapeutiques combinant radiothérapie et traitements systémiques, en particulier à l'époque actuelle où les thérapies ciblées se combinent et se multiplient, et où les schémas d'irradiation normo et hypofractionnés se côtoient et se substituent au quotidien.

Par ailleurs, suite à la description répétée d'une vague d'apoptose endothéliale après irradiation à dose élevée, nous avons émis l'hypothèse d'un seuil de dose par fraction situé entre 7 et 11 Gy, à partir duquel nous verrions une augmentation de l'hypoxie au sein des tumeurs. Nous n'avons pas constaté ce seuil. Au contraire, les fortes doses par fractions étaient associées à une réduction de l'hypoxie plus importante que pour les plus faibles doses. Dans les doses testées, la réponse tumorale compensait la baisse transitoire de densité microvasculaire. Une réduction plus importante de la densité microvasculaire pourrait tout de même aboutir à une augmentation de l'hypoxie et il n'est pas exclu que l'hypothétique seuil de dose soit simplement plus élevé que nous ne l'avions prévu en fonction des modèles tumoraux.

Ce résultat inattendu nous a néanmoins permis de constater que la part du compartiment tumoral dans la genèse de l'hypoxie était au moins aussi importante que la part vasculaire. Dans un contexte de stéréotaxie et de technologies de pointe, la question de l'étalement et de la repopulation cellulaire doit rester au cœur de nos préoccupations pour une lutte anticancéreuse efficace.

En termes de prédictibilité de la réponse tumorale et des tissus sains, le modèle linéaire-quadratique reste jusqu'ici le plus applicable en pratique quotidienne. L'application d'un quotient α/β pour la tumeur et pour chaque organe sain est acceptable et permet grossièrement d'anticiper ou d'expliquer les conséquences des schémas de radiothérapie normo et hypofractionnés jusqu'à 7 à 8 Gy par fraction, ce qui reste l'essentiel de l'activité courante. Néanmoins, il sera utile de garder en tête que la réalité est moins simpliste et qu'au sein même de chaque tumeur, les cellules tumorales et les différents éléments du microenvironnement (vasculaire ou autre) sont interdépendants, et ont eux-mêmes une radiosensibilité différente. A chaque fraction d'irradiation, la modulation de l'un ou l'autre aboutit à une cascade de conséquences dynamiques qui définiront la réponse à la fraction suivante selon la durée de l'étalement inter fraction. En l'état, nos connaissances biologiques et la puissance de nos calculs et réflexions ne permettent pas d'inclure et anticiper chaque paramètre. Dans notre lutte quotidienne contre le cancer, il est indispensable, pour continuer de progresser, de reconnaître humblement nos limites pour mieux les repousser.

Bibliographie

1. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(7):505-14.
2. Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):138-46.
3. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 19 mai 2011;473(7347):298-307.
4. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 20 mars 2012;21(3):309-22.
5. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*. 1 déc 1989;49(23):6449-65.
6. Nagy JA, Chang S-H, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer*. 24 mars 2009;100(6):865-9.
7. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. févr 2005;15(1):102-11.
8. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*. oct 2003;112(8):1142-51.
9. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 11 juill 1997;277(5323):242-5.
10. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev Cell*. août 2011;21(2):193-215.
11. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*. 1 août 2010;85(8):593-8.
12. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. 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. :8.
13. Kim J, de Sampaio PC, Lundy DM, Peng Q, Evans KW, Sugimoto H, et al. Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy. *JCI Insight* [Internet]. 22 déc 2016 [cité 31 août 2017];1(21). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/90733>
14. Keskin D, Kim J, Cooke VG, Wu C-C, Sugimoto H, Gu C, et al. Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2. *Cell Rep*. 24 févr 2015;10(7):1066-81.
15. Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y, et al. Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell*. janv 2012;21(1):66-81.

16. Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 21 févr 2001;93(4):266-76.
17. Martin JD, Fukumura D, Duda DG, Boucher Y, Jain RK. Reengineering the Tumor Microenvironment to Alleviate Hypoxia and Overcome Cancer Heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 12 janv 2016;6(12):a027094.
18. Sandoo A, van Zanten JJC. V, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 23 déc 2010;4:302-12.
19. Dewhirst MW, Secomb TW. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nat Rev Cancer.* déc 2017;17(12):738-50.
20. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, Jain RK, et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 janv 2012;109(3):911-6.
21. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The Role of Mechanical Forces in Tumor Growth and Therapy. *Annu Rev Biomed Eng.* 11 juill 2014;16(1):321-46.
22. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 18 sept 2012;109(38):15101-8.
23. Baish JW, Netti PA, Jain RK. Transmural coupling of fluid flow in microcirculatory network and interstitium in tumors. *Microvasc Res.* mars 1997;53(2):128-41.
24. Boucher Y, Jain RK. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.* 15 sept 1992;52(18):5110-4.
25. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 20 mars 2012;21(3):297-308.
26. Campbell PN. Principles of biochemistry second edition, by A L Lehninger, D L Nelson and M M Cox. Pp 1013. Worth, New York. 1993. £30 ISBN 0-87901-500-4. *Biochem Educ.* 1 avr 1993;21(2):114-114.
27. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* nov 2004;4(11):891-9.
28. Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, et al. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res.* 1 déc 1992;52(23):6553-60.
29. Endrich B, Reinhold HS, Gross JF, Intaglietta M. Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats. *J Natl Cancer Inst.* févr 1979;62(2):387-95.
30. Jain RK. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *J Clin Oncol.* 10 juin 2013;31(17):2205-18.
31. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 22 mai 2009;324(5930):1029-33.

32. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. mars 2008;8(3):180-92.
33. Stylianopoulos T, Munn LL, Jain RK. Reengineering the Tumor Vasculature: Improving Drug Delivery and Efficacy. *Trends Cancer*. avr 2018;4(4):258-9.
34. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1 mars 2006;98(5):335-44.
35. Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, Park J-H, Plaks V, Ewald AJ, et al. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell*. 17 avr 2012;21(4):488-503.
36. Cantelmo AR, Conradi L-C, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell*. 12 déc 2016;30(6):968-85.
37. Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*. juin 2007;26(2):249-60.
38. Cao Z, Scandura JM, Inghirami GG, Shido K, Ding B-S, Rafii S. Molecular Checkpoint Decisions Made by Subverted Vascular Niche Transform Indolent Tumor Cells into Chemoresistant Cancer Stem Cells. *Cancer Cell*. 9 janv 2017;31(1):110-26.
39. Tavora B, Reynolds LE, Batista S, Demircioglu F, Fernandez I, Lechertier T, et al. Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy. *Nature*. 2 oct 2014;514(7520):112-6.
40. Chan R, Sethi P, Jyoti A, McGarry R, Upreti M. Investigating the Radioresistant Properties of Lung Cancer Stem Cells in the Context of the Tumor Microenvironment. *Radiat Res*. févr 2016;185(2):169-81.
41. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*. juill 2004;14(3):198-206.
42. Mauge L, Terme M, Tartour E, Helley D. Control of the Adaptive Immune Response by Tumor Vasculature. *Front Oncol [Internet]*. 28 mars 2014 [cité 31 août 2017];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00061/abstract>
43. Motz GT, Santoro SP, Wang L-P, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med*. juin 2014;20(6):607-15.
44. Huang Y, Goel S, Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 15 mai 2013;73(10):2943-8.
45. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res*. 13 déc 2013;canres.0992.2013.
46. Tubiana M. Radiobiologie-Radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales.

47. Hennequin C, Dubray B. Le rapport alpha/bêta revisité à l'heure de l'hypofractionnement. *Cancer/Radiothérapie*. 1 oct 2013;17(5):344-8.
48. Shaikh T, Li T, Handorf EA, Johnson ME, Wang LS, Hallman MA, et al. Long-term patient reported outcomes from a phase III randomized prospective trial of conventional versus hypofractionated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15 mars 2017;97(4):722-31.
49. Bi N, Shedden K, Zheng X, Kong F-MS. Comparison of the Effectiveness of Radiofrequency Ablation With Stereotactic Body Radiation Therapy in Inoperable Stage I Non-Small Cell Lung Cancer: A Systemic Review and Pooled Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 01 2016;95(5):1378-90.
50. Bujold A, Massey CA, Kim JJ, Brierley J, Cho C, Wong RKS, et al. Sequential Phase I and II Trials of Stereotactic Body Radiotherapy for Locally Advanced Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol*. 1 mai 2013;31(13):1631-9.
51. Zimmermann M, Taussky D, Menkarios C, Vigneault É, Beauchemin M-C, Bahary J-P, et al. Prospective Phase II Trial of Once-weekly Hypofractionated Radiation Therapy for Low-risk Adenocarcinoma of the Prostate: Late Toxicities and Outcomes. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. 2016;28(6):386-92.
52. Incrocci L, Wortel RC, Alemayehu WG, Aluwini S, Schimmel E, Krol S, et al. Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with localised prostate cancer (HYPRO): final efficacy results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. août 2016;17(8):1061-9.
53. Catton CN, Lukka H, Gu C-S, Martin JM, Supiot S, Chung PWM, et al. Randomized Trial of a Hypofractionated Radiation Regimen for the Treatment of Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 juin 2017;35(17):1884-90.
54. Chang JY, Senan S, Paul MA, Mehran RJ, Louie AV, Balter P, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials. *Lancet Oncol*. juin 2015;16(6):630-7.
55. Fowler JF. Brief summary of radiobiological principles in fractionated radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 1 janv 1992;2(1):16-21.
56. Brenner DJ. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. *Semin Radiat Oncol*. oct 2008;18(4):234-9.
57. Kirkpatrick JP, Meyer JJ, Marks LB. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Semin Radiat Oncol*. oct 2008;18(4):240-3.
58. Shibamoto Y, Miyakawa A, Otsuka S, Iwata H. Radiobiology of hypofractionated stereotactic radiotherapy: what are the optimal fractionation schedules? *J Radiat Res (Tokyo)*. août 2016;57(S1):i76-82.
59. Jones B, Dale RG, Finst P, Khaksar SJ. Biological equivalent dose assessment of the consequences of hypofractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys*. 15 juill 2000;47(5):1379-84.
60. Murata R, Shibamoto Y, Sasai K, Oya N, Shibata T, Takagi T, et al. Reoxygenation after single irradiation in rodent tumors of different types and sizes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 mars 1996;34(4):859-65.

61. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* sept 2007;13(9):1050-9.
62. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, et al. Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect when Combined with Anti-CTLA-4 Antibody. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2009;15(17):5379-88.
63. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood.* 16 juill 2009;114(3):589-95.
64. Crockart N, Jordan BF, Baudelet C, Ansiaux R, Sonveaux P, Grégoire V, et al. Early reoxygenation in tumors after irradiation: determining factors and consequences for radiotherapy regimens using daily multiple fractions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 nov 2005;63(3):901-10.
65. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an iNOS+/M1 Phenotype that Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy. *Cancer Cell.* nov 2013;24(5):589-602.
66. Maeda A, Chen Y, Bu J, Mujcic H, Wouters BG, DaCosta RS. In Vivo Imaging Reveals Significant Tumor Vascular Dysfunction and Increased Tumor Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression Induced by High Single-Dose Irradiation in a Pancreatic Tumor Model. *Int J Radiat Oncol.* janv 2017;97(1):184-94.
67. Sonveaux P, Brouet A, Havaux X, Grégoire V, Dessy C, Balligand J-L, et al. Irradiation-induced Angiogenesis through the Up-Regulation of the Nitric Oxide Pathway: Implications for Tumor Radiotherapy. *Cancer Res.* 1 mars 2003;63(5):1012-9.
68. Song C, Hong B-J, Bok S, Lee C-J, Kim Y-E, Jeon S-R, et al. Real-time Tumor Oxygenation Changes After Single High-dose Radiation Therapy in Orthotopic and Subcutaneous Lung Cancer in Mice: Clinical Implication for Stereotactic Ablative Radiation Therapy Schedule Optimization. *Int J Radiat Oncol.* juill 2016;95(3):1022-31.
69. Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, Raleigh JA, Van der Kogel AJ. Changes in blood perfusion and hypoxia after irradiation of a human squamous cell carcinoma xenograft tumor line. *Radiat Res.* avr 2000;153(4):398-404.
70. Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, et al. M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Sci Rep.* 08 2016;6:27548.
71. Lan J, Wan X-L, Deng L, Xue J-X, Wang L-S, Meng M-B, et al. Ablative Hypofractionated Radiotherapy Normalizes Tumor Vasculature in Lewis Lung Carcinoma Mice Model. *Radiat Res.* avr 2013;179(4):458-64.
72. Jani A, Shaikh F, Barton S, Willis C, Banerjee D, Mitchell J, et al. High-Dose, Single-Fraction Irradiation Rapidly Reduces Tumor Vasculature and Perfusion in a Xenograft Model of Neuroblastoma. *Int J Radiat Oncol.* avr 2016;94(5):1173-80.
73. Wang H-H, Wu Z-Q, Qian D, Zaorsky NG, Qiu M-H, Cheng J-J, et al. Ablative Hypofractionated Radiotherapy Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Cell Killing Via Preferential Stimulation Of Necroptosis In Vitro And In Vivo. *Int J Radiat Oncol • Biol •*

Phys [Internet]. 3 févr 2018 [cité 7 févr 2018];0(0). Disponible sur: [http://www.redjournal.org/article/S0360-3016\(18\)30099-3/fulltext](http://www.redjournal.org/article/S0360-3016(18)30099-3/fulltext)

74. Røe K, Mikalsen LT, van der Kogel AJ, Bussink J, Lyng H, Ree AH, et al. Vascular responses to radiotherapy and androgen-deprivation therapy in experimental prostate cancer. *Radiat Oncol Lond Engl*. 23 mai 2012;7:75.
75. Song CW, Lee Y-J, Griffin RJ, Park I, Koonce NA, Hui S, et al. Indirect Tumor Cell Death After High-Dose Hypofractionated Irradiation: Implications for Stereotactic Body Radiation Therapy and Stereotactic Radiation Surgery. *Int J Radiat Oncol*. sept 2015;93(1):166-72.
76. Garcia-Barros M. Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. *Science*. 16 mai 2003;300(5622):1155-9.
77. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*. 1 mars 2010;120(3):694-705.
78. Ogawa K, Boucher Y, Kashiwagi S, Fukumura D, Chen D, Gerweck LE. Influence of Tumor Cell and Stroma Sensitivity on Tumor Response to Radiation. *Cancer Res*. 24 avr 2007;67(9):4016-21.
79. Chen F-H, Chiang C-S, Wang C-C, Tsai C-S, Jung S-M, Lee C-C, et al. Radiotherapy Decreases Vascular Density and Causes Hypoxia with Macrophage Aggregation in TRAMP-C1 Prostate Tumors. *Clin Cancer Res*. 17 févr 2009;15(5):1721-9.
80. Potiron VA, Abderrahmani R, Clément-Colmou K, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Paris F, et al. Improved Functionality of the Vasculature during Conventionally Fractionated Radiation Therapy of Prostate Cancer. Han Z, éditeur. *PLoS ONE*. 31 déc 2013;8(12):e84076.
81. Kane JL, Krueger SA, Hanna A, Raffel TR, Wilson GD, Madlambayan GJ, et al. Effect of Irradiation on Tumor Microenvironment and Bone Marrow Cell Migration in a Preclinical Tumor Model. *Int J Radiat Oncol*. sept 2016;96(1):170-8.
82. Bayer C, Kielow A, Schilling D, Maffei C-A, Zips D, Yaromina A, et al. Monitoring PAI-1 and VEGF Levels in 6 Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts During Fractionated Irradiation. *Int J Radiat Oncol*. 1 nov 2012;84(3):e409-17.
83. Yaromina A, Kroeber T, Meinzer A, Boeke S, Thames H, Baumann M, et al. Exploratory Study of the Prognostic Value of Microenvironmental Parameters During Fractionated Irradiation in Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Int J Radiat Oncol*. 15 juill 2011;80(4):1205-13.
84. Chen F-H, Fu S-Y, Yang Y-C, Wang C-C, Chiang C-S, Hong J-H. Combination of Vessel-Targeting Agents and Fractionated Radiation Therapy: The Role of the SDF-1/CXCR4 Pathway. *Int J Radiat Oncol*. juill 2013;86(4):777-84.
85. Ceelen W, Smeets P, Backes W, Van Damme N, Boterberg T, Demetter P, et al. Noninvasive monitoring of radiotherapy-induced microvascular changes using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) in a colorectal tumor model. *Int J Radiat Oncol*. mars 2006;64(4):1188-96.

86. Hu F, Vishwanath K, Salama JK, Erkanli A, Peterson B, Oleson JR, et al. Oxygen and Perfusion Kinetics in Response to Fractionated Radiation Therapy in FaDu Head and Neck Cancer Xenografts Are Related to Treatment Outcome. *Int J Radiat Oncol.* oct 2016;96(2):462-9.
87. Frenzel T, Hoffmann B, Schmitz R, Bethge A, Schumacher U, Wedemann G. Radiotherapy and chemotherapy change vessel tree geometry and metastatic spread in a small cell lung cancer xenograft mouse tumor model. *PloS One.* 2017;12(11):e0187144.
88. Fenton BM, Paoni SF, Grimwood BG, Ding I. Disparate effects of endostatin on tumor vascular perfusion and hypoxia in two murine mammary carcinomas. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys.* 15 nov 2003;57(4):1038-46.
89. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science.* 13 juill 2001;293(5528):293-7.
90. Matsumoto S, Batra S, Saito K, Yasui H, Choudhuri R, Gadisetti C, et al. Antiangiogenic agent sunitinib transiently increases tumor oxygenation and suppresses cycling hypoxia. *Cancer Res.* 15 oct 2011;71(20):6350-9.
91. Park J-S, Kim I-K, Han S, Park I, Kim C, Bae J, et al. Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 12 déc 2016;30(6):953-67.
92. Cully M. Cancer: Tumour vessel normalization takes centre stage [Internet]. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2017 [cité 10 août 2018]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nrd.2017.4>
93. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae S-S, Booth MF, Garkavtsev I, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation. *Cancer Cell.* déc 2004;6(6):553-63.
94. Burrell K, Hill RP, Zadeh G. High-Resolution In-Vivo Analysis of Normal Brain Response to Cranial Irradiation. *Tjwa M, éditeur. PLoS ONE.* 4 juin 2012;7(6):e38366.
95. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science.* 7 janv 2005;307(5706):58-62.
96. Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res.* févr 1999;36(1):2-27.
97. Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular Activation of Adhesion Molecule mRNA and Cell Surface Expression by Ionizing Radiation. *Exp Cell Res.* janv 1998;238(1):148-54.
98. Nisancioglu MH, Betsholtz C, Genové G. The absence of pericytes does not increase the sensitivity of tumor vasculature to vascular endothelial growth factor-A blockade. *Cancer Res.* 15 juin 2010;70(12):5109-15.
99. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood.* 15 nov 2003;102(10):3665-7.

100. Allende ML, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta*. 23 mai 2002;1582(1-3):222-7.
101. Choi S-H, Hong Z-Y, Nam J-K, Lee H-J, Jang J, Yoo RJ, et al. A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Clin Cancer Res*. 15 août 2015;21(16):3716-26.
102. Varga JA, Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*. févr 2008;34(1):115-43; vii.
103. Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:213-37.
104. Guipaud O, Jaillet C, Clément-Colmou K, François A, Supiot S, Milliat F. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br J Radiol*. 9 avr 2018;20170762.
105. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*. juill 2015;15(7):409-25.
106. Mpekris F, Angeli S, Pirentis AP, Stylianopoulos T. Stress-mediated progression of solid tumors: effect of mechanical stress on tissue oxygenation, cancer cell proliferation and drug delivery. *Biomech Model Mechanobiol*. nov 2015;14(6):1391-402.
107. Bromfield GP, Meng A, Warde P, Bristow RG. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. mars 2003;6(1):73-85.
108. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, et al. Stromal–epithelial metabolic coupling in cancer: Integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 juill 2011;43(7):1045-51.
109. Baker LCJ, Boulton JKR, Walker-Samuel S, Chung Y-L, Jamin Y, Ashcroft M, et al. The HIF-pathway inhibitor NSC-134754 induces metabolic changes and anti-tumour activity while maintaining vascular function. *Br J Cancer*. 8 mai 2012;106(10):1638-47.
110. Carvalho S, Troost EGC, Bons J, Menheere P, Lambin P, Oberije C. Prognostic value of blood-biomarkers related to hypoxia, inflammation, immune response and tumour load in non-small cell lung cancer - A survival model with external validation. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2016;119(3):487-94.
111. Eschmann S-M, Paulsen F, Reimold M, Dittmann H, Welz S, Reischl G, et al. Prognostic impact of hypoxia imaging with ¹⁸F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. févr 2005;46(2):253-60.
112. Kinoshita T, Fujii H, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H. Prognostic significance of hypoxic PET using (18)F-FAZA and (62)Cu-ATSM in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. janv 2016;91:56-66.
113. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):148-54.

114. Giraud P, Lacornerie T, Mornex F. Radiothérapie des cancers primitifs du poumon. *Cancer/Radiothérapie*. 1 sept 2016;20:S147-56.
115. de Crevoisier R, Pommier P, Latorzeff I, Chapet O, Chauvet B, Hennequin C. Radiothérapie externe des cancers prostatiques. *Cancer/Radiothérapie*. 1 sept 2016;20:S200-9.
116. Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC, et al. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. nov 1998;71(2):270-7.
117. Gaustad J-V, Simonsen TG, Leinaas MN, Rofstad EK. Sunitinib treatment does not improve blood supply but induces hypoxia in human melanoma xenografts. *BMC Cancer*. 4 sept 2012;12:388.
118. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. janv 2003;9(1):327-37.
119. Brooks C, Sheu T, Bridges K, Mason K, Kuban D, Mathew P, et al. Preclinical evaluation of sunitinib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, as a radiosensitizer for human prostate cancer. *Radiat Oncol Lond Engl*. 11 sept 2012;7:154.
120. Patel KJ, Trédan O, Tannock IF. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*. juill 2013;72(1):127-38.
121. Saggar JK, Fung AS, Patel KJ, Tannock IF. Use of molecular biomarkers to quantify the spatial distribution of effects of anticancer drugs in solid tumors. *Mol Cancer Ther*. avr 2013;12(4):542-52.
122. Bouakaz A, de Jong N. WFUMB Safety Symposium on Echo-Contrast Agents: nature and types of ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol*. févr 2007;33(2):187-96.
123. Dewhirst MW, Ong ET, Klitzman B, Secomb TW, Vinuya RZ, Dodge R, et al. Perivascular oxygen tensions in a transplantable mammary tumor growing in a dorsal flap window chamber. *Radiat Res*. mai 1992;130(2):171-82.
124. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. févr 1997;3(2):177-82.
125. Kuenen MPJ, Mischi M, Wijkstra H. Contrast-Ultrasound Diffusion Imaging for Localization of Prostate Cancer. *IEEE Trans Med Imaging*. août 2011;30(8):1493-502.
126. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. nov 1992;119(3):493-501.
127. Walker PR, Carson C, Leblanc J, Sikorska M. Labeling DNA damage with terminal transferase. Applicability, specificity, and limitations. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2002;203:3-19.

128. Xin Y, Jiang F, Yang C, Yan Q, Guo W, Huang Q, et al. Role of autophagy in regulating the radiosensitivity of tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. nov 2017;143(11):2147-57.
129. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK-M, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol*. 24 janv 2017;12:103-30.
130. Mercier G, Denis Y, Marc P, Picard L, Dutreix M. Transcriptional induction of repair genes during slowing of replication in irradiated. *Mutat Res*. 2001;16.
131. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*. 9 juin 2017;8:15618.
132. Sonveaux P, Dessy C, Brouet A, Jordan BF, GréGoire V, Gallez B, et al. Modulation of the tumor vasculature functionality by ionizing radiation accounts for tumor radiosensitization and promotes gene delivery. *FASEB J*. déc 2002;16(14):1979-81.
133. Stylianopoulos T, Martin JD, Snuderl M, Mpekris F, Jain SR, Jain RK. Co-evolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: Implications for vascular collapse. *Cancer Res*. 1 juill 2013;73(13):3833-41.
134. Znati CA, Rosenstein M, Boucher Y, Epperly MW, Bloomer WD, Jain RK. Effect of radiation on interstitial fluid pressure and oxygenation in a human tumor xenograft. *Cancer Res*. 1 mars 1996;56(5):964-8.
135. Lyng H, Sundfør K, Rofstad EK. Changes in tumor oxygen tension during radiotherapy of uterine cervical cancer: relationships to changes in vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis. *Int J Radiat Oncol*. mars 2000;46(4):935-46.
136. Kelada OJ, Decker RH, Nath SK, Johung KL, Zheng M-Q, Huang Y, et al. High single doses of radiation may induce elevated levels of hypoxia in early-stage non-small cell lung cancer tumors. *Int J Radiat Oncol* [Internet]. juin 2018 [cité 11 juin 2018]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301618308319>
137. Gabryś D, Greco O, Patel G, Prise KM, Tozer GM, Kanthou C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 déc 2007;69(5):1553-62.
138. Albert JM, Cao C, Geng L, Leavitt L, Hallahan DE, Lu B. Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 août 2006;65(5):1536-43.
139. Meng M-B, Zaorsky NG, Deng L, Wang H-H, Chao J, Zhao L-J, et al. Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncol*. janv 2015;11(1):169-79.
140. Davies C de L, Lundstrøm LM, Frengen J, Eikenes L, Bruland S ØS, Kaalhus O, et al. Radiation improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *Cancer Res*. 15 janv 2004;64(2):547-53.
141. Majesky MW, Dong XR, Regan JN, Hoglund VJ. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res*. 4 févr 2011;108(3):365-77.

142. Abramsson A, Berlin O, Papayan H, Paulin D, Shani M, Betsholtz C. Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels. *Circulation*. 1 janv 2002;105(1):112-7.
143. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*. 11 déc 2008;456(7223):809-13.
144. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. sept 2007;7(9):678-89.
145. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, et al. Vascular normalization in *Rgs5*-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature*. mai 2008;453(7193):410-4.
146. Xu Z, Dong Y, Peng F, Yu Z, Zuo Y, Dai Z, et al. Pigment epithelium-derived factor enhances tumor response to radiation through vasculature normalization in allografted lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther*. mars 2015;22(4):181-7.
147. Scott JG, Fletcher AG, Anderson ARA, Maini PK. Spatial Metrics of Tumour Vascular Organisation Predict Radiation Efficacy in a Computational Model. *PLoS Comput Biol*. janv 2016;12(1):e1004712.
148. Jeong J, Oh JH, Sonke J-J, Belderbos J, Bradley JD, Fontanella AN, et al. Modeling the Cellular Response of Lung Cancer to Radiation Therapy for a Broad Range of Fractionation Schedules. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2017;23(18):5469-79.
149. Gaertner FC, Souvatzoglou M, Brix G, Beer AJ. Imaging of hypoxia using PET and MRI. *Curr Pharm Biotechnol*. mars 2012;13(4):552-70.
150. Hompland T, Ellingsen C, Galappathi K, Rofstad EK. Connective tissue of cervical carcinoma xenografts: associations with tumor hypoxia and interstitial fluid pressure and its assessment by DCE-MRI and DW-MRI. *Acta Oncol Stockh Swed*. janv 2014;53(1):6-15.
151. Elmghirbi R, Nagaraja TN, Brown SL, Panda S, Aryal MP, Keenan KA, et al. Acute Temporal Changes of MRI-Tracked Tumor Vascular Parameters after Combined Anti-angiogenic and Radiation Treatments in a Rat Glioma Model: Identifying Signatures of Synergism. *Radiat Res [Internet]*. 21 déc 2016 [cité 3 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.rrjournal.org/doi/10.1667/RR14358.1>
152. Do QN, Ratnakar JS, Kovács Z, Sherry AD. Redox- and hypoxia-responsive MRI contrast agents. *ChemMedChem*. juin 2014;9(6):1116-29.
153. Huang T, Civelek AC, Li J, Jiang H, Ng CK, Postel GC, et al. Tumor microenvironment-dependent ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-fluorothymidine, and ¹⁸F-misonidazole uptake: a pilot study in mouse models of human non-small cell lung cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. août 2012;53(8):1262-8.
154. Eschmann SM, Paulsen F, Bedeshem C, Machulla H-J, Hehr T, Bamberg M, et al. Hypoxia-imaging with (¹⁸F)-Misonidazole and PET: changes of kinetics during radiotherapy of head-and-neck cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. juin 2007;83(3):406-10.

155. Hernández-Agudo E, Mondejar T, Soto-Montenegro ML, Megías D, Mouron S, Sanchez J, et al. Monitoring vascular normalization induced by antiangiogenic treatment with (18)F-fluoromisonidazole-PET. *Mol Oncol*. 2016;10(5):704-18.
156. Ganeshan B, Miles KA. Quantifying tumour heterogeneity with CT. *Cancer Imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc*. 26 mars 2013;13:140-9.
157. Lubner MG, Smith AD, Sandrasegaran K, Sahani DV, Pickhardt PJ. CT Texture Analysis: Definitions, Applications, Biologic Correlates, and Challenges. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. oct 2017;37(5):1483-503.
158. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 19 août 2010;363(8):711-23.
159. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 29 juill 2010;363(5):411-22.
160. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 21 mai 2015;372(21):2006-17.
161. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 25 mars 2011;331(6024):1565-70.
162. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol*. juill 2009;10(7):718-26.

ANNEXES : articles soumis

1. Preuves de soumission

Première page du pdf de confirmation des revues *International Journal of Radiotherapy, Oncology, Biology, Physics* et *Cancer Letters*.

International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics
Influence of radiotherapy fractionation schedule on tumor vascular microenvironment
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Biology Contribution
Corresponding Author:	Karen Clement-Colmou, M.D. CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France Saint-Herblain cedex, FRANCE
First Author:	Karen Clement-Colmou, M.D.
Order of Authors:	Karen Clement-Colmou, M.D. Vincent Potiron, Ph.D. Manon Pietri Maéva Guillonneau, Ph.D. Emmanuel Jouglar, M.D. Sophie Chiavassa, Ph.D. Grégory Delpon François Paris, Ph.D. Stéphane Supiot, M.D., Ph.D.
Abstract:	<p>Purpose: The tumor vasculature is crucial to the response to cancer treatments, acting as an interface between blood and tumor and regulating tumor oxygenation. While conventional fractionated radiotherapy (CFRT, 2Gy/day) has been shown to improve vasculature phenotype and functionality, high single doses have been shown to induce endothelial cell death. The impact of the repeated high doses used in hypofractionated RT (HFRT) on the tumor vascular microenvironment has not been clearly defined. Here, the consequences of various fractionation regimes on tumor vasculature phenotype, blood perfusion and hypoxia were investigated.</p> <p>Material and Methods: The response of the vasculature to RT was assessed in the highly proliferative LLC lung cancer and the moderately proliferative PC3 prostate cancer models. Subcutaneous tumors induced in mice received 20 to 24Gy over 2 weeks. The effects of fractionation regimes employing 2Gy, 4Gy, 8Gy or 12Gy fractions on tumor growth, microvascular density, pericyte coverage, tumor hypoxia and blood perfusion were compared.</p> <p>Results: The α/β ratios were 8.2 (LLC) and 2.1 (PC3). HFRT obtained a longer growth delay than CFRT in both models, but no significant difference was observed between the different HFRT schedules despite the different biological equivalent doses (BED). RT substantially increased vascular pericyte coverage regardless of the fractionation schedule. Tumor hypoxia decreased in a BED-dependent manner, while blood perfusion was enhanced at larger fractions. In the rapidly-repopulating LLC model, hypoxia, perfusion and microvascular density changes returned to baseline in the days following RT whereas the changes were more stable in the PC3 model.</p> <p>Conclusion: RT induced phenotypical BED-independent changes and functional BED-dependent changes in the tumor vasculature. Tumor response to HFRT did only partially correspond with the linear-quadratic expectations. Taking the vascular microenvironment into account in dose-response predictive models could help to better define response to HFRT.</p>

Manuscript Number: CAN-D-16-02621

Title: Tumor vasculature remodeling by radiation therapy increases doxorubicin distribution and efficacy

Article Type: Original Research Article

Keywords: radiotherapy; vascular normalization; drug distribution; chemotherapy; pericyte

Corresponding Author: Dr. Stephane Supiot, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Institut de Cancérologie de l'Ouest

First Author: Vincent Potiron, PhD

Order of Authors: Vincent Potiron, PhD; Karen Clément-Colmou, MD, PhD; Emmanuel Jouglar, MD, MSc; Manon Pietri, Msc; Sophie Chiavassa, PhD; Grégory Delpon, PhD; François Paris, PhD; Stephane Supiot, M.D., Ph.D.

Suggested Reviewers: Robert Bristow MD, PhD
University of Manchester
robert.bristow@manchester.ac.uk
expertise in radiobiology

Melvin Chua MD, PhD
University of Singapore
melvin.chua.l.k@singhealth.com.sg
Expertise in radiobiology

Stanley Liu MD, PhD
Odette cancer center, Sunnybrook
Stanley.Liu@sunnybrook.ca
expertise in radiobiology

Ian Tannock
Princess Margaret Hospital
Ian.Tannock@uhn.on.ca
Expertise in resistance to tumor drug delivery

Olivier Tredan MD, PhD
Centre Léon Bérard
olivier.tredan@lyon.unicancer.fr
Expertise in resistance to tumor drug delivery

Drug resistance and the solid tumor microenvironment. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 3;99(19):1441-54.

Martin Pruschy PhD
University of Zurich
Martin.Pruschy@usz.ch
Expertise in radiobiology of the endothelium

2. Article soumis à IJROBP

Influence of radiotherapy fractionation schedule on tumor vascular microenvironment

Karen Clément-Colmou*^{1,2,3}, Vincent Potiron*^{1,2}, Manon Pietri^{1,2}, Maëva Guillonnet^{1,2}, Emmanuel Jouglar^{1,2}, Sophie Chiavassa^{1,2,4}, Grégory Delpon^{1,2,4}, François Paris^{1,2}, Stéphane Supiot^{1,2,3}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

² LabCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

³ Service de radiothérapie, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

⁴ Service de physique médicale, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

*these authors contributed equally to the present work

Words (≤3500 including summary, abstract, text, and figure captions): 3499

Summary (max 75): 59

Abstract (max 300): 292

Text: 2604

Figure captions: 544

Figures/tables (max 6): 4 figures, 1 table

Running head: Hypofractionation and tumor vasculature

Keywords (3-6): Radiotherapy / fractionation / microenvironment / vasculature / hypoxia / stereotactic radiotherapy

Summary

This work aimed at determining the impact of fractionated radiotherapy on tumor vascular microenvironment, comparing conventional and hypofractionated schedules in two mouse tumor models. Fractionated RT enhanced vascular phenotype independently of the dose per fraction, increasing pericyte coverage without modifying microvascular density. In addition, tumor hypoxia and blood perfusion were influenced in a dose per fraction and time-dependent manner.

Abstract

Purpose: The tumor vasculature is crucial to the response to cancer treatments, acting as an interface between blood and tumor and regulating tumor oxygenation. While conventional fractionated radiotherapy (CFRT, 2Gy/day) has been shown to improve vasculature phenotype and functionality, high single doses have been shown to induce endothelial cell death. The impact of the repeated high doses used in hypofractionated RT (HFRT) on the tumor vascular microenvironment has not been clearly defined. Here, the consequences of various fractionation regimes on tumor vasculature phenotype, blood perfusion and hypoxia were investigated.

Material and Methods: The response of the vasculature to RT was assessed in the highly proliferative LLC lung cancer and the moderately proliferative PC3 prostate cancer models. Subcutaneous tumors induced in mice received 20 to 24Gy over 2 weeks. The effects of fractionation regimes employing 2Gy, 4Gy, 8Gy or 12Gy fractions on tumor growth, microvascular density, pericyte coverage, tumour hypoxia and blood perfusion were compared.

Results: The α/β ratios were 8.2 (LLC) and 2.1 (PC3). HFRT obtained a longer growth delay than CFRT in both models, but no significant difference was observed between the different HFRT schedules despite the different biological equivalent doses (BED). RT substantially increased vascular pericyte coverage regardless of the fractionation schedule. Tumor hypoxia decreased in a BED-dependant manner, while blood perfusion was enhanced at larger fractions. In the rapidly-repopulating LLC model, hypoxia, perfusion and microvascular density changes returned to baseline in the days following RT whereas the changes were more stable in the PC3 model.

Conclusion: RT induced phenotypical BED-independent changes and functional BED-dependent changes in the tumor vasculature. Tumor response to HFRT did only partially correspond with the linear-quadratic expectations. Taking the vascular microenvironment into account in dose-response predictive models could help to better define response to HFRT.

Introduction

Radiotherapy (RT) is mainly delivered in daily fractions of 2 Gy in order to allow healthy tissues to recover. Today's linear accelerators achieve higher precision and greater dose gradient, making hypofractionated RT (HFRT) possible (1). The attendant savings of time and travel benefit both patients and healthcare institutions. However, our knowledge of the biological effects of repeated high doses is limited and requires further study.

As well as the nature of the cancer cells themselves, the tumor microenvironment influences its the response to treatment, and the tumor vasculature plays a significant role in this (2). Fundamental parameters such as blood supply, oxygen level, immune response, tumor cell metabolism and cellular migration directly rely upon vasculature. As tumor vasculature is essentially composed of normal endothelial cells subjected to tumor excessive signals (3), tumor vessels are disorganized, poor pericyte-coated, undergo low pressure, and globally few efficient (4).

Strategies to restore the function of tumor vasculature have been proposed. In certain conditions, anti-angiogenic drugs have been shown to normalize vasculature, improving pericyte coverage, basal lamina continuity, and vascular permeability (4). In a similar pattern, low-dose fractionated RT is able to resume the normalization of tumor vasculature (5–7). Enhancement of pericyte coverage and blood perfusion, and hypoxia reduction without microvascular density (MVD) changes have been reported following CFRT (8).

The vascular consequences of HFRT are not so clearly understood. In contrast to CFRT, which does not systematically lead to MVD reduction even after high cumulated doses (8–10), single high doses have been shown to lead to a significant reduction in MVD (11–15) and even massive endothelial cell death (16, 17). A corresponding increase in hypoxia has sometimes been described (13, 18–20). There have been efforts to model a dose-response pattern, but the published studies are heterogenous, and remain inconclusive for high doses per fraction. It is possible that the tumor vasculature may respond differently to HFRT beyond a certain dose threshold.

The most commonly used mathematical model to extrapolate RT response and calculate biological equivalent doses (BED) is the linear quadratic model. It is derived from clonogenic assays on cell cultures and takes into account neither the close proximity of several cell types, nor the effect of the dose repetition (21). Furthermore, the radiosensitivity of the tumor vasculature is differs from both that of tumor cells and of normal vessels (22).

We therefore resolved to construct such a “dose scale” *in vivo*, with the aim of assessing the effects of different RT schedules on vascular microenvironment, with a particular emphasis on vascular phenotype, hypoxia, and blood perfusion using two tumor models.

Materials and methods

Mice and cell lines

As the tumor compartment may influence vascular microenvironment, we used two tumor models with different characteristics. The PC3 model is derived from a human prostate adenocarcinoma cell line, and has a moderate growth rate. The LLC model is derived from a mouse lung carcinoma cell line and has a fast growth rate.

PC3-Luc cells (Caliper Life Sciences, Villepinte, France) were cultivated in RPMI medium in standard conditions. Allogenic tumors were induced in 6 to 8 weeks old male NMRI nude mice (Janvier, Saint

Berthevin, France) by subcutaneous injection of 2×10^6 cells in 50 μL of medium without FBS, 21 days before RT.

LLC cells were cultivated in DMEM medium in standard conditions. Syngenic tumors were induced in 6 to 8 weeks old female C57bl/6 mice (Janvier, Saint Berthevin, France) by subcutaneous injection of 10^6 cells in 50 μL of medium without FBS, 10 days before RT.

Each group was composed of 30 to 50 mice (7 to 10 per fractionation schedule) and each experiment was repeated twice to assess reproducibility. Palpable tumors were measured with a caliper. Tumor volume was estimated with $0.5 \times a \times b^2$ formula (23). Tumors were excised 14 days after the first dose of RT. For the growth tumor assay, the limit volume was 2000 mm^3 .

All animal experiments were carried out in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE and approved by the local Animal Care and Use Committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale des Pays-de-la Loire, C2EA-06), under protocols APAFIS 529, APAFIS 2336. For intravenous injection, animals were anesthetized with 4% isoflurane. Sacrifice was done by cervical dislocation. Mice were systematically sacrificed if they showed signs of suffering or if tumor volume reached 2000 mm^3 .

Clonogenic survival assays

Clonogenic assays were performed as described previously (24). The basal clonogenic rate of PC3 and LLC was 50–60%. Cells were seeded 12 hours before irradiation. After 2 weeks, cells were stained with 0.5% crystal violet and colonies were counted using ImageJ (National Institute of Health, USA).

Radiotherapy

Mouse irradiation was performed using a CP-160 X-ray irradiator (Faxitron, Lincolnshire, IL) with an accelerating voltage of 160 kV and a dose rate of 1.3 Gy/min. Mice were immobilized during RT in custom-made contention plastic tubes, with a special aperture for the back left leg. RT was centered on the back left leg and the body and head of the mice were covered by lead shields designed to minimize irradiation to normal tissues. For the clonogenic assays, cells were irradiated with a Xrad-iR-225 irradiator (Precision X-ray, North Branford, CT) with an accelerating voltage of 225 kV and a dose rate of 1.78 Gy/min.

***In vivo* hypoxia and perfusion**

Hypoxia and perfusion were determined using specific markers that were administered in saline buffer. For hypoxia, 100 μL of 70 mg/ml pimonidazole (Hypoxyprobe, Burlington, USA) was injected intraperitoneally 90 minutes before sacrifice. For blood perfusion, 100 μL of 5 mg/ml Hoechst 33342 (Life Technologies, Saint Aubin, France) was injected intravenously 4 minutes before tissue collection.

Immunohistochemistry

MVD, pericyte coverage, hypoxia and blood perfusion were assessed by immunohistochemical stainings. Tumor was excised immediately after sacrifice and frozen in OCT medium. All stainings were realized on 5 micrometer frozen slices, fixed with 4% paraformaldehyde-PBS solution and permeabilized with 0.05% Triton-X100. Immunohistochemistry was performed using standard staining and washing procedures(8).

The following primary antibodies were used: rat anti-mouse CD31 (BD Biosciences), Cy3-conjugated mouse anti- αSMA (Sigma), rabbit anti-mouse desmin (Zymed), FITC-conjugated anti-pimonidazole (Hypoxyprobe, Burlington, USA). The secondary antibodies were: Alexa⁶⁴⁷-conjugated

goat anti-rabbit, Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-rat (Life Technologies). Slides were mounted in Prolong Gold with DAPI (Life Technologies) except for the perfusion assay with Hoechst 33342. Slides were observed using a Nanozoomer HT slide scanner at 20x or 40x resolution.

Image analysis

Each tumor slice was converted under identical recording and contrast conditions to a 16-bit TIFF file. Analysis were performed using Fiji software (NIH, USA) and automated for each range to record reproducible data, as previously described (8). A pericyte coverage index was obtained measuring the α SMA and Desmin positive area in a 2 micron perimeter around the CD31-positive area.

Statistics

Survival analyses were done by Kaplan-Meier method. Group comparisons were performed by ANOVA, or with Kruskal-Wallis test when Barlett's test for standard deviation was significant. Linear regression were done using minimizing sum-of-square method. Statistics calculations were realized with GraphPad Prism5 software (La Jolla, California, USA). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Effect of fractionation on tumor growth

The radiosensitivity of each tumor model was investigated *in vitro* and *in vivo*. PC3 cells showed greater radiosensitivity than LLC cells, and the calculated α/β ratios were respectively 2.1 and 8.2 (fig 1A). For the *in vivo* experiments, dose schedules were chosen in a progressive scale from standard to high dose per fraction, as much as 12Gy per fraction, with the aim of encompassing a possible dose threshold beyond which vascular response may be different. Similar physical total doses were used to avoid the biases of the LQ model in the high doses per fraction. The timing was designed to be clinically relevant (fig 1B): 10 x 2 Gy (standard), 6 x 4 Gy, 3 x 8 Gy and 2 x 12 Gy delivered on 2 weeks. The estimated BED are shown in the table 1.

To compare the anti-tumor effect of the different schedules, the time to achieve a 2000 mm³ volume was recorded for each mouse, and survival curves obtained. Average start volume was 167 mm³. The Kaplan-Meier diagrams are represented in the figures 1C-D. RT significantly impaired tumor growth in all fractionation schedules. In both models, HFRT delayed growth for longer than CFRT, but no significant differences were observed between the HFRT schedules even though they had different BED. In the PC3 model, HFRT schedules reduced tumor volume. The median survival in the HFRT groups was 63, 60 and 64 days versus 42 days in the 10x2Gy group and 20 days in the control group. In the faster-growing LLC model, there was no reduction of tumor volume but growth was slowed. Median growth delays were between 16 and 17 days in the RT groups versus 13 days in the control group.

Effect of fractionation on microvascular density

MVD was measured after 2 weeks of each RT schedule, on the theoretical time of the next RT fraction. MVD varied from 59 to 135 microvessels/mm² in the PC3 and LLC tumors, and was not significantly changed compared to control regardless of the fractionation schedule (figure 2A-C). MVD kinetics following the 2x12Gy schedule was then assessed: a transitory reduction was observed in the early 3 days following RT before a return to base level ($p=0.006$) (fig 2D-E).

RT increases pericyte coverage independently of the fractionation schedule

Standard RT has been shown to increase pericyte coverage. To investigate whether this change may depend on the fractionation schedule, we measured perivascular coverage using α SMA and desmin stainings (25)(fig 3A). Concordantly, both the α SMA and desmin indices showed similar evolution. Non-irradiated tumor vessels were poorly covered by pericytes. After RT, the pericyte coverage index was significantly increased, by up to 2.81 times in the PC3 model (fig 3B) and up to 8.24 times in the LLC model (fig 3C). The improvement in pericyte coverage was similar in all fractionation schedules in each model.

RT reduces tumor hypoxia and enhances perfusion in a BED and time-dependent manner

Severe hypoxia and blood perfusion were studied in the tumors, assessed by pimonidazole and Hoechst 33342 distribution (fig 4A-B).

In the non-irradiated PC3 tumors, the mean hypoxic surface was 9%. Hypoxic surface was reduced after all RT schedules. Hypoxia reduction was approximately BED-dependant, with a 64% and 57% hypoxic surface reduction in the standard and 6x4Gy arms and a 74% and 85% hypoxic surface reduction in the 3x8Gy and 2x12Gy arms ($p > 0.0001$)(fig 4C).

LLC tumors were much more hypoxic than PC3 tumors: the pimonidazole-positive area was 29% in the non-irradiated tumors. Hypoxia reduction in the LLC tumors was heterogeneous, with a 21% reduction in the standard arm (NS) and a 38% reduction in the 6x4Gy arm compared to control ($p = 0.03$)(fig 4D). Unlike the PC3 model, there was no hypoxia reduction in the most hypofractionated arms.

Because the LLC tumors are fast-growing, the hypothesis that cell repopulation could compensate the hypoxia reduction in the larger inter-fraction times was considered. Hypoxia measurements from 1 to 7 days following 2x12Gy are represented in the fig 4E. Hypoxia was constant up to 72 hours after the last RT dose, followed by a heterogeneous non-significant increase.

The study of hypoxia was complemented by consideration of blood perfusion, as represented by measurement of the Hoechst33342-perfused surface. In the PC3 model, perfused surface was increased from 28% to 218% following the BED ($p > 0.0001$) (fig 4F). In the LLC model, perfused surface was not significantly increased compared to control in any of the arms (fig 4G). Perfusion kinetics was then assessed following 2x12Gy. Hoechst distribution showed a transitory increase up to 72 hours before returning to the baseline at day 15 ($p = 0.04$)(fig 4H).

Discussion

This work aimed at defining the influence of RT on tumor vascular microenvironment, focusing on the link between fractionation schedule and phenotypical and functional vascular parameters. We found that vasculature phenotypical changes were not affected by the dose per fraction, but hypoxia and perfusion underwent BED-dependent changes. Moreover, the duration and depth of the oxygenation changes seemed to be linked to the repopulation capacity of the tumor cells.

BED and RT efficacy were not as strongly related as traditional radiobiology principles might suggest. Though HFRT was generally more effective than standard fractionation, all HFRT schedules achieved similar tumor reductions in the PC3 model. In the LLC model, a difference emerged rather between a “high HFRT” groups including 8 and 12 Gy / fraction and a “low HFRT and standard” group. The inapplicability of the linear quadratic model for large doses per fraction has been repeatedly demonstrated (14, 26, 27), and such results again highlights the need of predictive models for HFRT (28). In the particularly resistant LLC cell line, tumor cell death seems to occur only above 8Gy, which

may engage different cell death mechanisms. As an illustration, necroptosis have been shown to exceed apoptosis and mitotic catastrophe above 10 Gy in lung tumors (29).

The tumor oxygen level is the complex resultant of the balance between oxygen consumption and supply. Here the noticeable BED-related hypoxia and perfusion changes, despite a stable vascular phenotype, suggests that RT dose influences tumor parameters that affect oxygen consumption (30). Hypoxia reduction is not consistently proportional to perfusion enhancement, which implies that other parameters than tumor cell metabolism may affect the level of tumor hypoxia (31). In particular, the decrease in tumor cell density may facilitate blood perfusion. Indeed, physical strengths are often neglected but may play a major role for the access of oxygen and blood nutrients to cells (32, 33). In tumors, the vascular pressure is low and the cell and matrix density are high. The depth and duration of oxygenation enhancement observed in this study, low in the fast-growing, radioresistant LLC model and greater in the slow-growing, sensitive PC3 model, supports the possible importance of inner tension in addition to the reduced oxygen consumption of the senescent or unproliferative cells (34). Shortening the period between fractions for fast proliferating tumors might achieve efficient vascular remodeling that limits tumor hypoxia.

Contrary to an intuitive hypothesis, the observed MVD remained stable even after repeated high doses such as 2x12Gy. However, massive endothelial cell death occurring soon after RT has been reported (16) and the death of mural cells may be compensated by angiogenesis or senescence-induced vasculogenesis (5). As a supplemental contributor to vascular stability, the radio-induced restoration of vascular pericyte coverage may act as a mechanical reinforcement against external compressions and participate to perfusion enhancement (35). Pericyte coverage has consistently been shown to be partly restored after fractionated RT (5, 8, 12, 15), though the reports of changes to pericyte coverage following single dose RT are heterogeneous (9, 12, 29). However, whether there is a quantitative relationship between fractionated RT dose and perivascular coverage had not been investigated. In both our models, pericyte coverage was increased independently of the fractionation regimen. The role and the mechanism of recruitment of pericytes in cancer biology are incompletely defined. As a physiological part of the vascular compartment, pericytes are implicated in blood flow and blood-tissue barrier regulation in normal tissue. Then, the improvement of perivascular coverage by RT could participate to vascular soundness even after high RT doses and improve delivery of immune system and systemic therapies (25, 36, 37), offering an alternative to the vascular normalization induced by anti-angiogenic drugs (38, 39). Moreover, the reinforcement of pericyte vessel stabilization has been shown to have a positive impact on survival and response to other systemic treatments (40–42)

In conclusion, this study reveals that RT modifies tumor vascular microenvironment playing on different BED-dependent and BED-independent entangled mechanisms. There is a necessity to upgrade the dose-response predictive models to take vascular microenvironment into consideration and better define and improve tumor response to RT.

References

1. Śłosarek K. Stereotactic RT systems and techniques overview. *Radiother. Oncol.* 2015;115:1.
2. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 2013;19:1423–1437.
3. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2010;10:505–514.
4. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science.* 2005;307:58–62.

5. Chen F-H, Fu S-Y, Yang Y-C, et al. Combination of Vessel-Targeting Agents and Fractionated Radiation Therapy: The Role of the SDF-1/CXCR4 Pathway. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2013;86:777–784.
6. Burrell K, Hill RP, Zadeh G. High-Resolution In-Vivo Analysis of Normal Brain Response to Cranial Irradiation Tjwa M, ed. *PLoS ONE.* 2012;7:e38366.
7. Hu F, Vishwanath K, Salama JK, et al. Oxygen and Perfusion Kinetics in Response to Fractionated Radiation Therapy in FaDu Head and Neck Cancer Xenografts Are Related to Treatment Outcome. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2016;96:462–469.
8. Potiron VA, Abderrahmani R, Clément-Colmou K, et al. Improved Functionality of the Vasculature during Conventionally Fractionated Radiation Therapy of Prostate Cancer Han Z, ed. *PLoS ONE.* 2013;8:e84076.
9. Jani A, Shaikh F, Barton S, et al. High-Dose, Single-Fraction Irradiation Rapidly Reduces Tumor Vasculature and Perfusion in a Xenograft Model of Neuroblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2016;94:1173–1180.
10. Song C, Hong B-J, Bok S, et al. Real-time Tumor Oxygenation Changes After Single High-dose Radiation Therapy in Orthotopic and Subcutaneous Lung Cancer in Mice: Clinical Implication for Stereotactic Ablative Radiation Therapy Schedule Optimization. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2016;95:1022–1031.
11. Chen F-H, Chiang C-S, Wang C-C, et al. Radiotherapy Decreases Vascular Density and Causes Hypoxia with Macrophage Aggregation in TRAMP-C1 Prostate Tumors. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:1721–1729.
12. Lan J, Wan X-L, Deng L, et al. Ablative Hypofractionated Radiotherapy Normalizes Tumor Vasculature in Lewis Lung Carcinoma Mice Model. *Radiat. Res.* 2013;179:458–464.
13. Kioi M, Vogel H, Schultz G, et al. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* 2010;120:694–705.
14. Ogawa K, Boucher Y, Kashiwagi S, et al. Influence of Tumor Cell and Stroma Sensitivity on Tumor Response to Radiation. *Cancer Res.* 2007;67:4016–4021.
15. Kane JL, Krueger SA, Hanna A, et al. Effect of Irradiation on Tumor Microenvironment and Bone Marrow Cell Migration in a Preclinical Tumor Model. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2016;96:170–178.
16. Garcia-Barros M. Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. *Science.* 2003;300:1155–1159.
17. Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science.* 2001;293:293–297.
18. Park HJ, Griffin RJ, Hui S, et al. Radiation-Induced Vascular Damage in Tumors: Implications of Vascular Damage in Ablative Hypofractionated Radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiat. Res.* 2012;177:311–327.
19. Song CW, Lee Y-J, Griffin RJ, et al. Indirect Tumor Cell Death After High-Dose Hypofractionated Irradiation: Implications for Stereotactic Body Radiation Therapy and Stereotactic Radiation Surgery. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2015;93:166–172.
20. Kelada OJ, Decker RH, Nath SK, et al. High single doses of radiation may induce elevated levels of hypoxia in early-stage non-small cell lung cancer tumors. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2018.
21. Supiot S, Clément-Colmou K, Paris F, et al. Which rules apply to hypofractionated radiotherapy? *Cancer/Radiothérapie.* 2015;19:421–425.
22. Guipaud O, Jaillet C, Clément-Colmou K, et al. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 2018:20170762.
23. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1989;24:148–154.
24. Potiron VA, Abderrhamani R, Giang E, et al. Radiosensitization of prostate cancer cells by the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 under normoxic and hypoxic conditions. *Radiother. Oncol.* 2013;106:138–146.
25. Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry.* 1993;99:1–12.

26. Park HJ, Griffin RJ, Hui S, et al. Radiation-induced vascular damage in tumors: implications of vascular damage in ablative hypofractionated radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiat. Res.* 2012;177:311–327.
27. Jones B, Dale RG, Finst P, et al. Biological equivalent dose assessment of the consequences of hypofractionated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 2000;47:1379–1384.
28. Paul-Gilloteaux P, Potiron V, Delpon G, et al. Optimizing radiotherapy protocols using computer automata to model tumour cell death as a function of oxygen diffusion processes. *Sci. Rep.* 2017;7:2280.
29. Wang H-H, Wu Z-Q, Qian D, et al. Ablative Hypofractionated Radiation Therapy Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Cell Killing via Preferential Stimulation of Necroptosis In Vitro and In Vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 2018;101:49–62.
30. Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2001;93:266–276.
31. Martin JD, Fukumura D, Duda DG, et al. Reengineering the Tumor Microenvironment to Alleviate Hypoxia and Overcome Cancer Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016;6:a027094.
32. Stylianopoulos T, Munn LL, Jain RK. Reengineering the Physical Microenvironment of Tumors to Improve Drug Delivery and Efficacy: From Mathematical Modeling to Bench to Bedside. *Trends Cancer.* 2018;4:292–319.
33. Stylianopoulos T, Munn LL, Jain RK. Reengineering the Tumor Vasculature: Improving Drug Delivery and Efficacy. *Trends Cancer.* 2018;4:258–259.
34. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324:1029–1033.
35. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell.* 2011;21:193–215.
36. Meng M-B, Zaorsky NG, Deng L, et al. Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncol.* 2015;11:169–179.
37. Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, et al. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell.* 2012;21:488–503.
38. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011;10:417–427.
39. Potiron V, Clement-Colmou K, Jouglar E, et al. Tumor Vasculature Remodeling By Radiation Therapy Increases Doxorubicin Distribution And Efficacy. In preparation.
40. Park J-S, Kim I-K, Han S, et al. Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2016;30:953–967.
41. Kim J, de Sampaio PC, Lundy DM, et al. Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy. *JCI Insight.* 2016;1.
42. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* 2010;85:593–598.

Figure captions

Figure 1. Response to RT in the two experimental models

In vitro clonogenic assays after single-dose irradiation for the PC3 and the LLC cells. Experimental calendar and schedules.

and D. Kaplan-Meier survival curves of the subcutaneous tumors. The animal was counted as dead when the tumor volume reached 2000mm³ or when presenting signs of suffering. C is the PC3 tumor model and D is the LLC tumor model

Figure 2. Tumor vasculature phenotype: microvascular density

Immunohistological pictures of tumor vessels at day 15, in the different RT schedules. Microvessels are represented by endothelial cells (CD31, green).

and C. Microvascular density count on the PC3 (B) and LLC (C) tumors at day 15 after each RT schedule. The control arm was also obtained on day 15.

and E. Immunohistological assessment of microvascular density kinetics after 2x12Gy in the LLC model. Tumors were excised at day 9, 11, 15 corresponding to 1,3 and 7 days after the last RT dose. The control tumors were excised at day 9.

Figure 3. Tumor vasculature phenotype: pericyte coverage

Immunohistological images of the subcutaneous tumor microvessels and pericyte coverage at day 15 after the different RT schedules. The green staining is CD31 (endothelium). The red staining is α -Smooth-Muscle Actin (α SMA, pericytes). The white staining is Desmin (pericytes).

B. and C. Tumor vascular pericyte coverage indexes for PC3 (B) and LLC (C) tumors at day 15, showing the area of α SMA and desmin staining surrounding vessels. The pericyte coverage index was compared separately for α SMA and for desmin. In both cases, a significant difference was found between the control group and each RT group. There was no significant difference between the RT groups.

Figure 4. Hypoxia and perfusion

Immunohistological images of tumor vessels at day 15, after the different RT schedules. Red is CD31 staining (endothelium), green is pimonidazole staining (severe hypoxic zones) and blue is Hoechst 33342 staining (well perfused nuclei).

Immunohistological assessment of hypoxia and perfusion kinetics after 2x12Gy in the LLC model. Tumors were excised at day 9, 11, 15 corresponding to 1, 3 and 7 days after the last dose of RT. The control tumors were excised at day 9.

C. and D. Severely hypoxic areas in the PC3 (C) and LLC (D) tumors at day 15 after the different RT schedules. The hypoxia index is represented by the pimonidazole-positive surface to total surface ratio. A linear regression curve plotting hypoxia index with BED as the dependent variable is represented in grey.

E. Hypoxia kinetics after 2x12Gy in the LLC model. Tumors were excised at day 9, 11, 15 corresponding to 1,3 and 7 days after the last RT dose. The control tumors were excised at day 9.

F. and G. Well-perfused area in the PC3 (C) and LLC (D) tumors at day 15 after the different RT schedules. The perfusion index is represented by the Hoechst 33342-positive surface to total surface ratio. A linear regression curve plotting hypoxia index with the BED as the dependent variable is represented in grey.

H. Perfusion kinetics after 2x12Gy in the LLC model. Tumors were excised at day 9, 11, 15 corresponding to 1, 3 and 7 days after the last RT dose. The control tumors were excised at day 9.

Figure 1

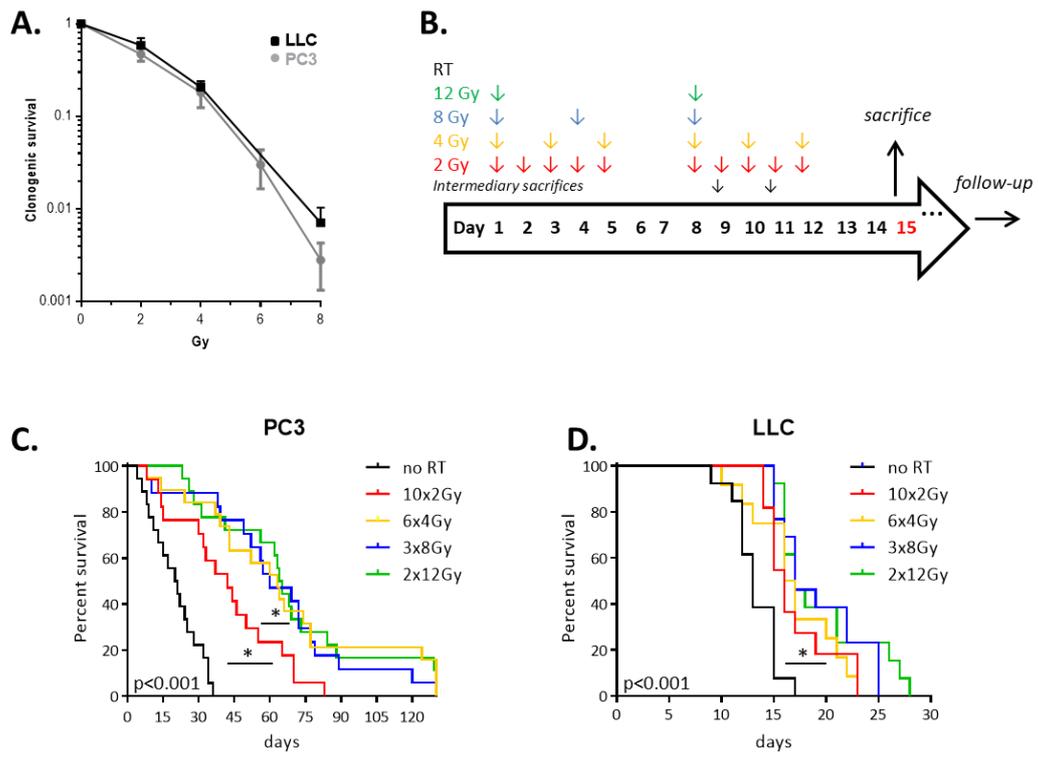


Figure 2

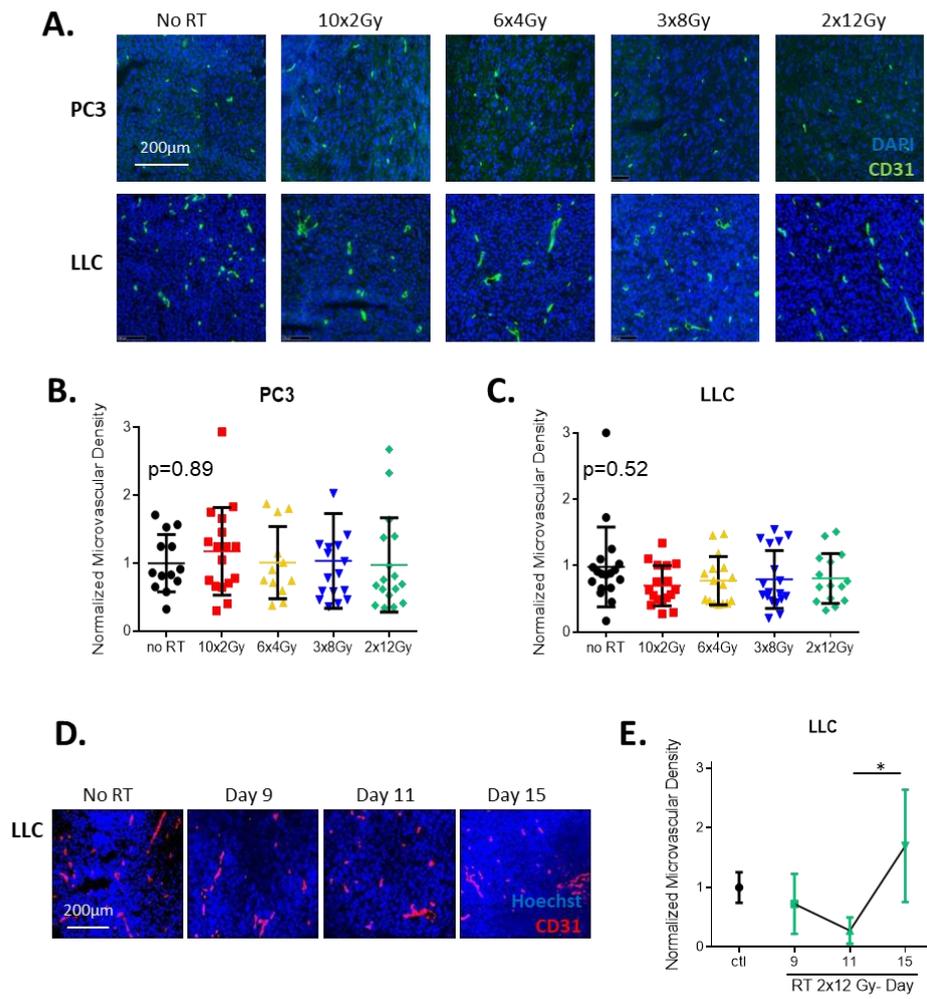


Figure 3

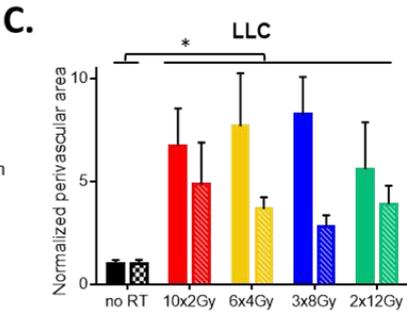
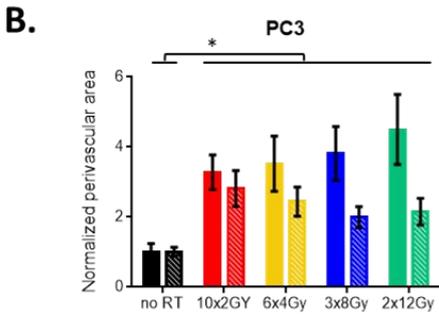
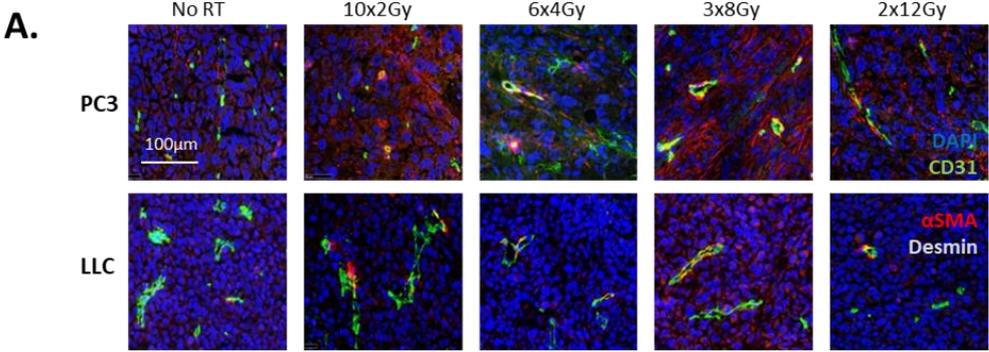
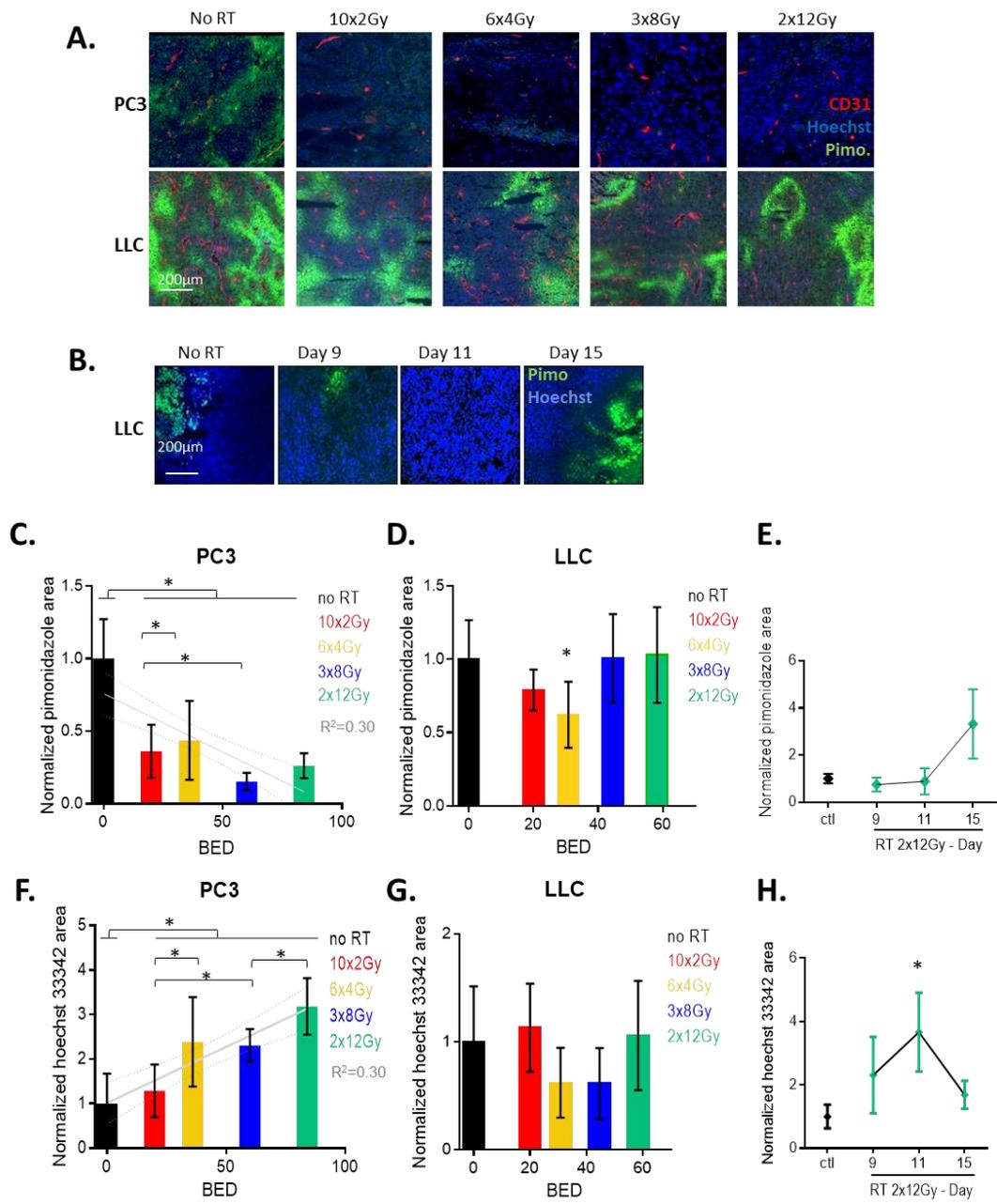


Figure 4



3. Article soumis à cancer Letters

Tumor vasculature remodeling by radiation therapy increases doxorubicin distribution and efficacy

Vincent Potiron^{1,2*}, Karen Clément-Colmou^{1,2*}, Emmanuel Jouglar^{1,2}, Manon Pietri^{1,2}, Sophie Chiavassa^{1,2}, Grégory Delpon^{1,2}, François Paris^{1,2}, Stéphane Supiot^{1,2}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

² Institut de Cancérologie de l'Ouest René Gauducheau, Saint-Herblain, France

* These authors contributed equally to the work

Keywords: radiotherapy, vascular normalization, drug distribution, chemotherapy, pericyte

Abbreviations: doxo: doxorubicin, MVD: microvascular density, RIVR: radiation-induced vascular remodeling, RT: radiation therapy

Abstract word count: 164

Word count: 3498

Figures: 6

Supplemental figures: 0

References: 44

Corresponding author: S. Supiot, Institut de Cancérologie de l'Ouest René Gauducheau, Bvd Jacques Monod, 44800 Saint-Herblain, France. Phone: +33240679900; Fax: +33240679722; E-mail: stephane.supiot@ico.unicancer.fr

Conflicts of interests: the authors claim no potential conflicts of interest

Acknowledgements: We thank Sylvia Lambot and UTE IRS-UN for technical help with animal experiments, Stéphanie Blandin and MicroPicell for assistance with histology.

Funding: This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue contre le Cancer and Institut National du Cancer.

Abstract

The tumor microenvironment regulates cancer initiation, progression and response to treatment. In particular, the immature tumor vasculature may impede drugs from reaching tumor cells at a lethal concentration. We and others have shown that radiation therapy (RT) induces pericyte recruitment, resembling vascular normalization. Here, we asked whether radiation-induced vascular remodeling translates into improved tissue distribution and efficacy of chemotherapy.

First, RT induced vascular remodeling, accompanied by decreased hypoxia and/or increased Hoechst perfusion in prostate PC3 and LNCaP and Lewis Lung Carcinoma. These results were independent of the RT regimen, respectively 10 x 2 Gy and 2 x 12 Gy, suggesting a common effect. Next, using doxorubicin as a fluorescent reporter, we observed that RT improves intra-tumoral chemotherapy distribution. These effects were not hindered by anti-angiogenic sunitinib. Moreover, sub-optimal doses of doxorubicin had almost no effect alone, but significantly delayed tumor growth after RT.

These data demonstrate that RT favors the efficacy of chemotherapy by improving tissue distribution, and could be an alternative chemosensitizing strategy.

1. Introduction

Even in the current era of targeted therapies, the limited distribution of drugs remains a challenge [13]. This is due in part to the abnormal tumor vasculature, which has developed as a function of anarchic tumor expansion. The resulting network is tortuous, over-branched, variable in diameter and abnormally permeable [19, 35]. All these factors contribute to reducing blood flow and consequently, the transport of therapeutic compounds. Independently, tumor cell density creates a compressive environment that blunts the endothelial lumen and limits extravasation of molecules because of high interstitial pressure [33]. Beyond drug distribution, the abnormal vasculature generates hypoxia and acidosis, leading to metabolism switch and the emergence of therapeutic resistances [5].

Hence, there is considerable need for a strategy to improve vascular function. The current literature places emphasis on vascular normalization [24], rather than on anti-angiogenic agents that can have limited efficacy [16, 25]. Moreover, destructing angiogenesis or altering vascular maturation could favor metastasis [10, 15, 27, 37]. Consequently, many drugs have been explored for their vascular normalizing potency [1, 19, 23].

To be sound from a clinical standpoint, such strategies should be as close as possible to existing practice. External radiotherapy (RT) is a standard treatment for about half of cancer patients, either alone or in combination with surgery and/or chemotherapy [4]. In general, RT is given as a fractionated regimen of about 2 Gy/day over a course of several weeks, to achieve a total dose of 40-80 Gy depending on tumor type and conformation. Recent advances in beam ballistics have enabled hypofractionated protocols whose biological responses remain largely unexplored. In particular, endothelial death after irradiation might be triggered only above $\approx 5-10$ Gy [17].

Ultimately, RT leads to the destruction of target tissues. However, this process is gradual and allows time for complex biological phenomena to occur. We have previously shown in a xenograft prostate model that radiotherapy induces perivascular coverage of tumor microvessels [40]. This prompted us to investigate if RT favors intra-tumoral drug distribution. Anthracyclines such as doxorubicin are good examples of chemotherapeutics for which tissue distribution greatly govern biological response *in vivo* [39]. Moreover, doxorubicin is naturally fluorescent in the range of 500-600 nm [38]. This made doxorubicin a stereotype candidate to study drug delivery. Indeed, vascular normalization has been shown to enhance doxorubicin accumulation [28, 41].

In this study, we evaluated if 10 x 2 Gy and 2 x 12 Gy external X-ray irradiation induces a vascular normalization phenotype during which distribution and anti-tumor activity of the small molecule doxorubicin is more efficient, using prostate and lung xenograft models.

2. Materials and Methods

2.1 Animal experiments

Prostate PC3 model: 6/8 week male NMRI-nude mice (Janvier, Saint Berthevin, France) were engrafted with subcutaneous injection of 2×10^6 PC3-luc cells (Caliper Life Sciences, Villepinte, France). Lewis Lung Carcinoma model: 6/8 week female C57BL/6 mice (Janvier, Saint Berthevin, France) were engrafted subcutaneously with 10^6 LLC cells (LL/2, LGC Standards, Molsheim, France). Tumor growth was measured with a digital caliper ($v = 0.5 \cdot ab^2$ with a = largest diameter and b its perpendicular) and experiments begun when tumors reached ≈ 200 mm³ (PC3: 3 weeks, LLC: 9 days). Prostate LNCaP model: 6/8 week male NMRI-nude mice were anesthetized with ketamine/xylazine (50/15 mg/kg) and 5×10^6 LNCaP-luc cells (Caliper Life Sciences) were injected in the left dorsolateral lobe of the prostate by laparotomy. Tumor uptake was followed weekly by luminescence using a PhotonImager (BiospaceLab, Paris, France) and groups with similar bioluminescence were formed (5 weeks). After sacrifice, tissues were frozen-embedded in OCT medium at -80°C (Sakura Finetek, Villeneuve D'ascq, France). All experiments were done twice with groups ≥ 6 .

All animal experiments were carried out in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE and approved by the local Animal Care and Use Committee (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale des Pays-de-la Loire, C2EA-06) under protocols 01262.01, APAFIS 529, APAFIS 2336.

2.2 Radiation therapy

Irradiations were performed using a CP-160 X-ray irradiator (Faxitron, Lincolnshire, IL) with a 0.3 mm Cu filter, an accelerating voltage of 160 kV and a dose rate in the tumor of 1.3 Gy/min. Dose rate was determined according to the TG61 protocol [31] and from measurements in depth with a plane-parallel Roos ionization chamber (PTW GmbH, Freiburg, Germany) [36]. Animals received a dose of 2 Gy daily, 5 days per week (LNCaP, PC3) or 12 Gy weekly (LLC) for two weeks (= 10 x 2 Gy and 2 x 12 Gy), centered on the tumor-bearing region using lead shields.

2.3 Functional parameters and treatments

Hypoxia was evaluated by pimonidazole reactivity. Hundred μ l of 70 μ g/ml pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe, Burlington, USA) was injected i.p. 2h before sacrifice. Detection was performed by immunohistochemistry with FITC-conjugated antibody. Hoechst perfusion was evaluated by i.v. injection of 100 μ l of 5 mg/ml Hoechst 33342 (Ozyme, Saint St-Quentin-en-Yvelines, France) 5 min before sacrifice. Doxorubicin distribution was assessed by i.v. injection of 100 μ l of 18 mg/ml doxorubicin hydrochloride (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) 5 min before sacrifice [38]. Detection was performed using a Nanozoomer HT fluorescence slide scanner (Hamamatsu Photonics, Massy, France) at 594 nm. Doxorubicin was given at 8 mg/kg i.p. for survival assays. Sunitinib was given per os at 40 mg/kg daily in pH 3.5 saline solution with 10% PEG300 [18].

2.4 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using previously published staining procedures [40]. The following antibodies were used: rat anti-mouse CD31 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), Cy3-conjugated mouse anti-alpha smooth muscle actin (Sigma), Alexa⁶⁴⁷-conjugated goat anti-rabbit and Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-rat (Life Technologies). Slides were mounted in Prolong Gold with DAPI (Life Technologies) for nuclei counterstaining (except for the perfusion assays) and observed using a Nanozoomer slide scanner at 40x with fluorescence.

2.5 Image analysis

Analyses were performed on original 16-bit tiff images at 40x resolution using ImageJ 1.46r software (National Institutes of Health, USA) as previously described [40]. Vessels were counted as groups formed by CD31-positive pixels distant of $\leq 1 \mu$ m. The perivascular area was defined as the 2 μ m region surrounding CD31-positive objects. Hypoxic zones were pimonidazole-reactive regions of $> 10 \mu$ m² that contained nuclei (DAPI).

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a two-tailed Mann-Whitney test with 95% confidence estimations, or a Kruskal-Wallis test with alpha risk = 0.05 followed by Dunn's post-test for multiple comparisons (GraphPad Prism5, La Jolla, California, USA). Pseudo-survival (morbidity) analyses were done by Kaplan-Meier curve and estimate. Data were considered significant at $p \leq 0.05$ (*), ≤ 0.01 (**) and ≤ 0.001 (***) .

3. Results

3.1 Radiotherapy improves vascular physiology in different tumor models

We have previously shown that standard fractionated irradiation (2 Gy/day) leads to coverage of the tumor endothelium by pericytes in a preclinical model of prostate cancer (PC3) [40]. We also observed that perfusion was increased after two weeks of standard fractionated RT. To pursue these findings, we assessed two RT schemes using additional models: LNCaP (androgen-dependent prostate cancer, slow growing) and Lewis Lung Carcinoma (syngeneic C57BL/6 model, fast growing). Orthotopic luciferase-LNCaP derived tumors with a linear increase in bioluminescence (= 5 weeks post-graft) were irradiated daily using a standard 2 Gy dose Monday-Friday for two weeks (= 10 x 2 Gy). On the other hand, subcutaneous LLC tumors of ≈ 200 mm³ were treated with a schedule of two 12 Gy fractions (each Monday for two weeks, = 2 x 12 Gy), since standard fractionation does not control tumor growth in this model (Clément-Colmou *et al*, in preparation). Also, for LLC, two groups of controls were initially used to compare to tumors irradiated for two weeks (RT): "ctl d0" (first day of experiment) matched size and "ctl d14" (two weeks of experiment) matched age of the RT group. Because LNCaP (and PC3 later on) growth is slower, d14 controls were sufficient.

In the LNCaP model, 10 x 2 Gy RT did not reduce microvessel density (Fig. 1A,C). In the LLC model, 2 x 12 Gy RT limited microvessel density (-47%, $p < 0.001$, Fig. 1B,D). In both models, an increase in α -SMA positive mural cells was observed in the 2 μ m region around endothelial cells (CD31+) after two weeks of RT compared to non-irradiated tumors (LNCaP: +119%, $p = 0.05$, Fig. 1A,E; LLC, +65%, $p = 0.02$, Fig. 1B,F). Desmin costaining was also evident in LNCaP (Fig. 1A) and LLC (Clément-Colmou *et al*, submitted). There was no statistical difference between unirradiated LLC tumors harvested at d0 or d14 (Fig. 1B,D,F). At the functional level, RT slightly increased penetration of the Hoechst nuclear dye in LNCaP tumors (+40%, $p = 0.08$, Fig. 2A,C) and significantly favored its diffusion in LLC tumors (+75%, $p = 0.04$, Fig. 2B,D). Also, hypoxic area in pimonidazole-injected LNCaP tumors was greatly attenuated (-88%, $p = 0.004$, Fig. 2A,E). We have precedently used subcutaneous or orthotopic PC3 tumors with similar results (Potiron *et al*, 2013, Clément-Colmou *et al*, submitted). In addition, vascular remodeling was observed in both syngeneic (LLC) and immunocompromised (LNCaP, PC3) models. Collectively, these data indicate that RT generally improves vascular physiology in solid tumors after the first two weeks of treatment.

Radiotherapy is often combined with concomitant or neo-adjuvant chemotherapy. Anti-angiogenic compounds would be the most likely to affect radiotherapy-induced vascular remodeling (RIVR). We thus questioned if RIVR is robust and compatible with sunitinib, an EMA/FDA-approved inhibitor of the receptor tyrosine kinases VEGFR and PDGFR for which vascular normalization has been conflictually reported [34]. The LLC model was chosen because PC3 cells have been shown to respond to sunitinib, at least *in vitro* [6]. Mice bearing established LLC tumors were irradiated at 2 x 12 Gy and concomitantly fed daily with 40 mg/kg sunitinib or vehicle solution. After two weeks of treatment, vascular parameters were assessed as described above. Sunitinib reduced tumor microvessel density compared to control, in a similar manner to RT in that model (ctl: 104 vessels/mm², Sut: 56, RT: 74, ctl vs RT $p = 0.02$; ctl vs Sut $p = 0.0001$, Fig. 3A,C). The combination of RT+sunitinib did not further downregulate tumor microvessel density (RT+Sut: 68, NS vs RT or Sut). Moreover, sunitinib did not prevent perivascular coverage by α -SMA+ cells (RT+Sut: +224% vs ctl, $p < 0.0001$, Fig. 3A,D). Nevertheless, we noted that combination of sunitinib+RT increased hypoxia (ctl: 18.2% area; RT+Sut: 41%; +125%, $p = 0.01$; Fig. 3B,E).

3.2 Radiotherapy improves intra-tumoral diffusion of doxorubicin

To assess whether RIVR allows increased intra-tumoral accumulation of small molecule chemotherapy, we monitored distribution of doxorubicin (doxo). Established subcutaneous PC3 and LLC tumors were subjected to RT (respectively 10 x 2 Gy and 2 x 12 Gy) for two weeks, the period where remodeling of the vasculature is observed. Mice were then injected with 18 mg/kg doxorubicin *i.v.* and intra-tumoral distribution was assessed using fluorescence microscopy 5 min after injection [38]. Whereas doxorubicin was detected at low levels in control tumors, irradiated tumors displayed significantly higher drug accumulation (PC3: +331%, $p = 0.006$, Fig. 4A,B; LLC: +508%, $p = 0.05$ Fig. 4A,C). This was not due to tumor age or size since untreated LLC tumors collected at the beginning (ctl d0) or end (ctl d14) of RT planning had similarly low doxorubicin levels (Fig. 4A,C). The profile was consistent

with that of a vascular-administrated drug, yielding high doxorubicin positivity close to blood vessels and diminishing with distance (Fig. 4D). Notably, RT increased doxorubicin content both close to and at distance from vessels, compared to control.

To extend the observation that sunitinib did not interfere with RIVR, doxorubicin area was assessed in the context of concomitant planning as precedently. As expected, RT increased drug distribution compared to control (ctl: 1.1% total area, RT: 4.4, $p=0.02$; Fig. 5A,B). However, sunitinib had no effect alone (Sut: 1.3%) and did not counteract RT-induced distribution (RT+Sut: 4.4%, $p=0.02$ vs ctl).

3.3 Radiotherapy improves doxorubicin efficacy

Chemotherapy effectiveness is strongly dependent on the dose that can be achieved in situ [42]. We thus questioned whether increased doxorubicin delivery is accompanied with higher drug efficacy. First, we determined a starting dose of doxorubicin which exhibits mild anti-tumor growth. Based on dose-response effect, 8 mg/kg i.p. was chosen (Fig. 6A,B) to mimic a situation where the drug concentration is below the effective dose 50. To investigate whether prior irradiation enhances drug efficacy, doxorubicin was administered on the beginning of week 3, thus at an interval (3d) after the last RT fraction to minimize biochemical radiosensitization. In the PC3 model, while doxorubicin barely affected tumor growth when delivered alone, treatment after RT induced a significant shift in morbidity compared to RT alone (median survival ctl: 43 days, doxo: 43 days, RT: 53.5 days, RT+ doxo: 68 days, $p<0.0001$, Fig. 6C). In the LLC model, doxorubicin administration after RT also delayed tumor growth better than when given alone (median survival ctl: 18 days, doxo: 23 days, RT: 24.5 days, RT+ doxo: 33.5 days, $p<0.0001$, Fig. 6D).

4. Discussion

Efficient diffusion of chemotherapeutics is a challenge that is currently under extensive exploration. For this purpose, the concept of vascular normalization has gained interest. In this study, we questioned if external radiotherapy, a standard anti-cancer treatment, could favor small molecule distribution and efficacy.

First, we show that external radiotherapy reproducibly improves vascular function in tumor models with different kinetics and different RT schedules, after two weeks of treatment. Secondly, we show that RT increases intra-tumoral doxorubicin diffusion. Thirdly, we show that doxorubicin delivered after radiotherapy has higher efficacy on tumor growth. Moreover, combination with anti-angiogenic sunitinib does not counteract RIVR nor drug delivery. Overall, these data establish a proof of concept that RIVR could be helpful for delivering cancer chemotherapeutics.

Radiotherapy has been shown to increase efficacy and distribution of liposomal doxorubicin in the context of concomittant treatment [11]. This is of interest, since chemotherapies are routinely used as radiosensitizing agents, but dosage is often limited due to toxicity of the combination. We show here that radiotherapy improves efficacy of chemotherapy later (3 days) after irradiation. Our results suggest that radiotherapy could be used to enhance local efficacy of chemotherapy in the target tumor without the need for concomittant planning and undesired toxicity. This would be expected to increase the benefit/risk ratio of chemotherapy/radiotherapy association. Such strategies could even be tested in radioresistant tumors for the sole purpose of increasing their sensitivity to chemotherapy. This might extend to larger molecules since enhancement of antibody uptake has been reported after RT [26]. Moreover, based on our data using sunitinib, anti-angiogenic drugs are compatible as well with the caveat of monitoring hypoxia. Interestingly, sunitinib itself has been shown to be more efficient after irradiation, although its distribution was not investigated [6]. Novel technologies now allow for non-invasive imaging of tumor oxygenation and vascular changes [2, 43]. Thus, clinical trials

testing the chemosensitizing properties of localized irradiation should monitor vascular parameters to identify the best timing for association with chemotherapy.

Penetration of molecules results from the combination of physical and biological factors relating to tumor cells, vessels and stroma [13]. Short-term (hours) after irradiation, vessels have been shown to react by increasing permeability [12, 32]. Alternatively at later times, high-dose irradiation has been associated with vessel death [17, 32] and decreased MVD [8, 29]. However, decreased MVD is not systematic and there is also evidence for increased perfusion in long-term response to RT [40]. Based on the literature, it is likely that RT initially destabilizes vessel structure and selects established mature vessels (e.g. vascular pruning, hours), but induces vascular remodeling and pericyte recruitment in a second phase (days) during which vascular function is optimal. Additionally, parameters such as composition and stiffness of the extracellular matrix [7], pH, interstitial fluid pressure [30], density of tumor cells and repopulation time after RT [33] will also affect drug distribution. Thus, extensive research will be required to clarify which parameters are specifically affected by RT.

We have previously observed that fractionated daily 10 x 2 Gy RT leads to vascular coverage by α -SMA/desmin mural cells, decreased hypoxia and enhancement of perfusion [40]. Similar findings were reported by Lan *et al* (2013) after 3 x 12 Gy [29] and Chen *et al* (2013) after 15 x 4 Gy [9]. In this study, we found several parameters indicative of vascular normalization in each of the prostate PC3, LNCaP and lung LLC models, including reduced pimonidazole retention (hypoxia) and increased Hoechst and doxorubicin distribution after doses of 10 x 2 Gy or 2 x 12 Gy. Collectively, these data argue that radiotherapy-induced vascular remodeling is a common response.

Vascular normalization was originally reported as a transient phenomenon [44]. This is of particular interest when considering potential clinical applications. We have found that RT initiates changes starting at one week of RT and becomes more evident after the second week [40]. Similar findings have been made by independent laboratories [8, 9, 29]. We show here that chemotherapy delivery is more efficient at two weeks of RT, a timing that seems concordant throughout independent studies.

Pericytes belong to a versatile cell population whose function and origin is still under debate [14, 22]. Their interaction with endothelial cells is dynamic during vascular development and maturation [3]. Experiments in conditional depletion models have shown that lack of pericytes impairs vascular function and favors metastasis [10, 27]. Whether pericytes contribute to upregulating perfusion in a radiotherapy context is not completely elucidated, although deprivation using AMD3100 reinduced hypoxia [9]. Nevertheless, the function of pericytes in regulating blood flow is currently questioned [21]. Moreover, despite inducing hypoxia, AMD3100 delayed tumor growth. So, pericytes may exhibit ambivalent roles in facilitating drug delivery and reoxygenation while maintaining blood vessel function to support tumor growth [20]. Further studies will be needed to better characterize the impact of mural cells in the tumor response to radiotherapy.

References

- [1] A.M. Al-Abd, A.J. Alamoudi, A.B. Abdel-Naim, T.A. Neamatallah, O.M. Ashour, Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies - A review, *Journal of advanced research*, 8 (2017) 591-605.
- [2] T. Barrett, M. Brechbiel, M. Bernardo, P.L. Choyke, MRI of tumor angiogenesis, *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 26 (2007) 235-249.
- [3] A.A. Berthiaume, R.I. Grant, K.P. McDowell, R.G. Underly, D.A. Hartmann, M. Levy, N.R. Bhat, A.Y. Shih, Dynamic Remodeling of Pericytes In Vivo Maintains Capillary Coverage in the Adult Mouse Brain, *Cell reports*, 22 (2018) 8-16.

- [4] J.M. Borrás, Y. Lievens, P. Dunscombe, M. Coffey, J. Malicki, J. Corral, C. Gasparotto, N. Defourny, M. Barton, R. Verhoeven, L. van Eycken, M. Primic-Zakelj, M. Trojanowski, P. Strojanc, C. Grau, The optimal utilization proportion of external beam radiotherapy in European countries: An ESTRO-HERO analysis, *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 116 (2015) 38-44.
- [5] R.G. Bristow, R.P. Hill, Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability, *Nature reviews. Cancer*, 8 (2008) 180-192.
- [6] C. Brooks, T. Sheu, K. Bridges, K. Mason, D. Kuban, P. Mathew, R. Meyn, Preclinical evaluation of sunitinib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, as a radiosensitizer for human prostate cancer, *Radiation oncology*, 7 (2012) 154.
- [7] V.P. Chauhan, J.D. Martin, H. Liu, D.A. Lacorre, S.R. Jain, S.V. Kozin, T. Stylianopoulos, A.S. Mousa, X. Han, P. Adstamongkonkul, Z. Popovic, P. Huang, M.G. Bawendi, Y. Boucher, R.K. Jain, Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels, *Nature communications*, 4 (2013) 2516.
- [8] F.H. Chen, C.S. Chiang, C.C. Wang, C.S. Tsai, S.M. Jung, C.C. Lee, W.H. McBride, J.H. Hong, Radiotherapy decreases vascular density and causes hypoxia with macrophage aggregation in TRAMP-C1 prostate tumors, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (2009) 1721-1729.
- [9] F.H. Chen, S.Y. Fu, Y.C. Yang, C.C. Wang, C.S. Chiang, J.H. Hong, Combination of vessel-targeting agents and fractionated radiation therapy: the role of the SDF-1/CXCR4 pathway, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 86 (2013) 777-784.
- [10] V.G. Cooke, V.S. LeBleu, D. Keskin, Z. Khan, J.T. O'Connell, Y. Teng, M.B. Duncan, L. Xie, G. Maeda, S. Vong, H. Sugimoto, R.M. Rocha, A. Damascena, R.R. Brentani, R. Kalluri, Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway, *Cancer cell*, 21 (2012) 66-81.
- [11] L. Davies Cde, L.M. Lundstrom, J. Frengen, L. Eikenes, S.O. Bruland, O. Kaalhus, M.H. Hjelstuen, C. Brekken, Radiation improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (caelyx) in human osteosarcoma xenografts, *Cancer research*, 64 (2004) 547-553.
- [12] P.L. Debbage, S. Seidl, A. Kreczy, P. Hutzler, M. Pavelka, P. Lukas, Vascular permeability and hyperpermeability in a murine adenocarcinoma after fractionated radiotherapy: an ultrastructural tracer study, *Histochemistry and cell biology*, 114 (2000) 259-275.
- [13] M.W. Dewhirst, T.W. Secomb, Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue, *Nature reviews. Cancer*, 17 (2017) 738-750.
- [14] P.H. Dias Moura Prazeres, I.F.G. Sena, I.D.T. Borges, P.O. de Azevedo, J.P. Andreotti, A.E. de Paiva, V.M. de Almeida, D.A. de Paula Guerra, G.S. Pinheiro Dos Santos, A. Mintz, O. Delbono, A. Birbrair, Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue, *Developmental biology*, 427 (2017) 6-11.
- [15] J.M. Ebos, C.R. Lee, W. Cruz-Munoz, G.A. Bjarnason, J.G. Christensen, R.S. Kerbel, Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis, *Cancer cell*, 15 (2009) 232-239.
- [16] R.N. Gacche, Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness, *Oncogenesis*, 4 (2015) e153.
- [17] M. Garcia-Barros, F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, R. Kolesnick, Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis, *Science*, 300 (2003) 1155-1159.
- [18] J.V. Gaustad, T.G. Simonsen, M.N. Leinaas, E.K. Rofstad, Sunitinib treatment does not improve blood supply but induces hypoxia in human melanoma xenografts, *BMC cancer*, 12 (2012) 388.
- [19] S. Goel, D.G. Duda, L. Xu, L.L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, R.K. Jain, Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases, *Physiological reviews*, 91 (2011) 1071-1121.
- [20] R. Hamdan, Z. Zhou, E.S. Kleinerman, Blocking SDF-1 α /CXCR4 downregulates PDGF-B and inhibits bone marrow-derived pericyte differentiation and tumor vascular expansion in Ewing tumors, *Molecular cancer therapeutics*, 13 (2014) 483-491.

- [21] R.A. Hill, L. Tong, P. Yuan, S. Murikinati, S. Gupta, J. Grutzendler, Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes, *Neuron*, 87 (2015) 95-110.
- [22] A. Holm, T. Heumann, H.G. Augustin, Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity, *Trends in cell biology*, (2018).
- [23] D. Huang, H. Lan, F. Liu, S. Wang, X. Chen, K. Jin, X. Mou, Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution, *International journal of clinical and experimental medicine*, 8 (2015) 8369-8376.
- [24] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science*, 307 (2005) 58-62.
- [25] R.K. Jain, D.G. Duda, J.W. Clark, J.S. Loeffler, Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer, *Nature clinical practice. Oncology*, 3 (2006) 24-40.
- [26] H. Kalofonos, G. Rowlinson, A.A. Epenetos, Enhancement of monoclonal antibody uptake in human colon tumor xenografts following irradiation, *Cancer research*, 50 (1990) 159-163.
- [27] D. Keskin, J. Kim, V.G. Cooke, C.C. Wu, H. Sugimoto, C. Gu, M. De Palma, R. Kalluri, V.S. LeBleu, Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2, *Cell reports*, 10 (2015) 1066-1081.
- [28] S.J. Kim, K.H. Jung, M.K. Son, J.H. Park, H.H. Yan, Z. Fang, Y.W. Kang, B. Han, J.H. Lim, S.S. Hong, Tumor vessel normalization by the PI3K inhibitor HS-173 enhances drug delivery, *Cancer letters*, 403 (2017) 339-353.
- [29] J. Lan, X.L. Wan, L. Deng, J.X. Xue, L.S. Wang, M.B. Meng, H. Ling, X. Zhang, X.M. Mo, Y. Lu, Ablative hypofractionated radiotherapy normalizes tumor vasculature in lewis lung carcinoma mice model, *Radiation research*, 179 (2013) 458-464.
- [30] S.J. Lunt, A. Fyles, R.P. Hill, M. Milosevic, Interstitial fluid pressure in tumors: therapeutic barrier and biomarker of angiogenesis, *Future oncology*, 4 (2008) 793-802.
- [31] C.M. Ma, C.W. Coffey, L.A. DeWerd, C. Liu, R. Nath, S.M. Seltzer, J.P. Seuntjens, M. American Association of Physicists in, AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology, *Medical physics*, 28 (2001) 868-893.
- [32] A. Maeda, Y. Chen, J. Bu, H. Mujcic, B.G. Wouters, R.S. DaCosta, In Vivo Imaging Reveals Significant Tumor Vascular Dysfunction and Increased Tumor Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression Induced by High Single-Dose Irradiation in a Pancreatic Tumor Model, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 97 (2017) 184-194.
- [33] J.D. Martin, D. Fukumura, D.G. Duda, Y. Boucher, R.K. Jain, Reengineering the Tumor Microenvironment to Alleviate Hypoxia and Overcome Cancer Heterogeneity, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6 (2016).
- [34] D.B. Mendel, A.D. Laird, X. Xin, S.G. Louie, J.G. Christensen, G. Li, R.E. Schreck, T.J. Abrams, T.J. Ngai, L.B. Lee, L.J. Murray, J. Carver, E. Chan, K.G. Moss, J.O. Haznedar, J. Sukbuntherng, R.A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon, J.M. Cherrington, In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9 (2003) 327-337.
- [35] J.A. Nagy, S.H. Chang, S.C. Shih, A.M. Dvorak, H.F. Dvorak, Heterogeneity of the tumor vasculature, *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 36 (2010) 321-331.
- [36] C. Noblet, S. Chiavassa, F. Paris, S. Supiot, A. Lisbona, G. Delpon, Underestimation of dose delivery in preclinical irradiation due to scattering conditions, *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics*, 30 (2014) 63-68.
- [37] M. Paez-Ribes, E. Allen, J. Hudock, T. Takeda, H. Okuyama, F. Vinals, M. Inoue, G. Bergers, D. Hanahan, O. Casanovas, Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis, *Cancer cell*, 15 (2009) 220-231.

- [38] K.J. Patel, O. Tredan, I.F. Tannock, Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 72 (2013) 127-138.
- [39] D.B. Pink, W. Schulte, M.H. Parseghian, A. Zijlstra, J.D. Lewis, Real-time visualization and quantitation of vascular permeability in vivo: implications for drug delivery, *PLoS one*, 7 (2012) e33760.
- [40] V.A. Potiron, R. Abderrahmani, K. Clement-Colmou, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, F. Paris, S. Supiot, Improved functionality of the vasculature during conventionally fractionated radiation therapy of prostate cancer, *PLoS one*, 8 (2013) e84076.
- [41] N. Qayum, J. Im, M.R. Stratford, E.J. Bernhard, W.G. McKenna, R.J. Muschel, Modulation of the tumor microvasculature by phosphoinositide-3 kinase inhibition increases doxorubicin delivery in vivo, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18 (2012) 161-169.
- [42] J.K. Saggar, A.S. Fung, K.J. Patel, I.F. Tannock, Use of molecular biomarkers to quantify the spatial distribution of effects of anticancer drugs in solid tumors, *Molecular cancer therapeutics*, 12 (2013) 542-552.
- [43] S. Supiot, C. Rousseau, M. Dore, C. Cheze-Le-Rest, C. Kandel-Aznar, V. Potiron, S. Guerif, F. Paris, L. Ferrer, L. Campion, P. Meingan, G. Delpon, M. Hatt, D. Visvikis, Evaluation of tumor hypoxia prior to radiotherapy in intermediate-risk prostate cancer using (18)F-fluoromisonidazole PET/CT: a pilot study, *Oncotarget*, 9 (2018) 10005-10015.
- [44] F. Winkler, S.V. Kozin, R.T. Tong, S.S. Chae, M.F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D.J. Hicklin, D. Fukumura, E. di Tomaso, L.L. Munn, R.K. Jain, Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases, *Cancer cell*, 6 (2004) 553-563.

Figure legends

Figure 1. RT induces vascular coverage. (A, B) representative scanner images of immunohistochemistry for endothelial cells (CD31) and pericytes (α -SMA/desmin) in LNCaP (A) and LLC (B) tumors. (C, D) CD31+ vessel density in LNCaP (C) and LLC (D) tumors. (E, F) quantification of α -SMA+ area around CD31+ vessels in LNCaP (E) and LLC (F) tumors. (C-F) values represent the average of $n \geq 5 \pm \text{sem}$ (LNCaP) and ≥ 9 (LLC).

Figure 2. RT induces increased perfusion and/or decreased hypoxia. (A, B) representative scanner images of LNCaP (A) and LLC (B) tumors injected with pimonidazole and/or Hoechst 33342. (C, D) quantification of Hoechst 33342+ area ratio to total tissue area in LNCaP (C) and LLC (D) tumors. (E) quantification of pimonidazole+ area ratio to total tissue area in LLC tumors. (C-E) values represent the average of $n \geq 5 \pm \text{sem}$ (LNCaP) and ≥ 9 (LLC).

Figure 3. RIVR is not affected by anti-angiogenic sunitinib in LLC tumors. (A) representative scanner images of immunohistochemistry for endothelial cells (CD31) and pericytes (α -SMA) in LLC tumors treated with RT, sunitinib or combination. (B) representative scanner images of LLC tumors injected with pimonidazole. (C) CD31+ vessel density in LLC tumors \pm sunitinib. (D) quantification of α -SMA+ area around CD31+ vessels in LLC tumors \pm sunitinib. (E) quantification of pimonidazole area ratio to total tissue area in LLC tumors \pm sunitinib. (C-E) values represent the average of $n \geq 13 \pm \text{sem}$.

Figure 4. RT improves intra-tumoral drug distribution. (A) representative scanner images of PC3 (left column) and LLC (right column) tumors injected with doxorubicin i.v. (B, C) quantification of doxorubicin area ratio to total tissue area in PC3 (B) and LLC (C) tumors. Values represent the average of $n \geq 9 \pm \text{sem}$. (D) plot profile of doxorubicin distribution as a function of distance to nearest vessel in PC3 tumors.

Figure 5. Increased doxorubicin diffusion is not reversed by anti-angiogenic sunitinib. (A) representative scanner images of LLC tumors injected with doxorubicin i.v. and treated with RT, sunitinib or combination. (B) quantification of doxorubicin area ratio to total tissue. Values represent the average of $n \geq 13 \pm \text{sem}$.

Figure 6. RT improves drug efficacy. (A, B) tumor size of PC3 (A) and LLC (B) tumors treated with increasing doxorubicin doses. Values represent the average of $n \geq 3 \pm \text{sem}$. (C, D) pseudo-survival curves (Kaplan-Meier analysis) of PC3 (C) and LLC (D) tumors treated by doxorubicin alone, RT and doxorubicin 3 days after RT. (C, D) Values represent the average of $n \geq 8$ per group.

Figure 1

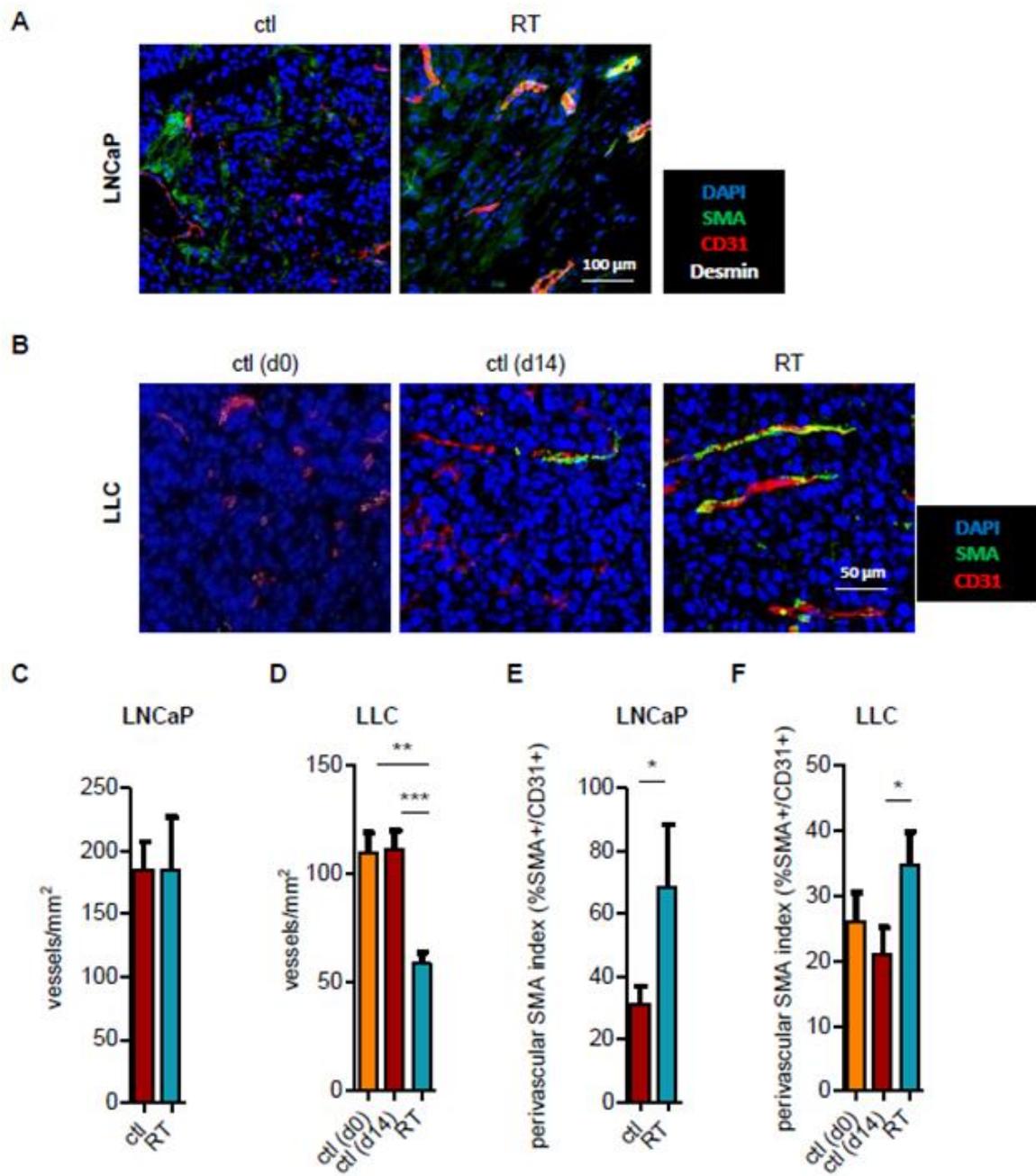


Figure 2

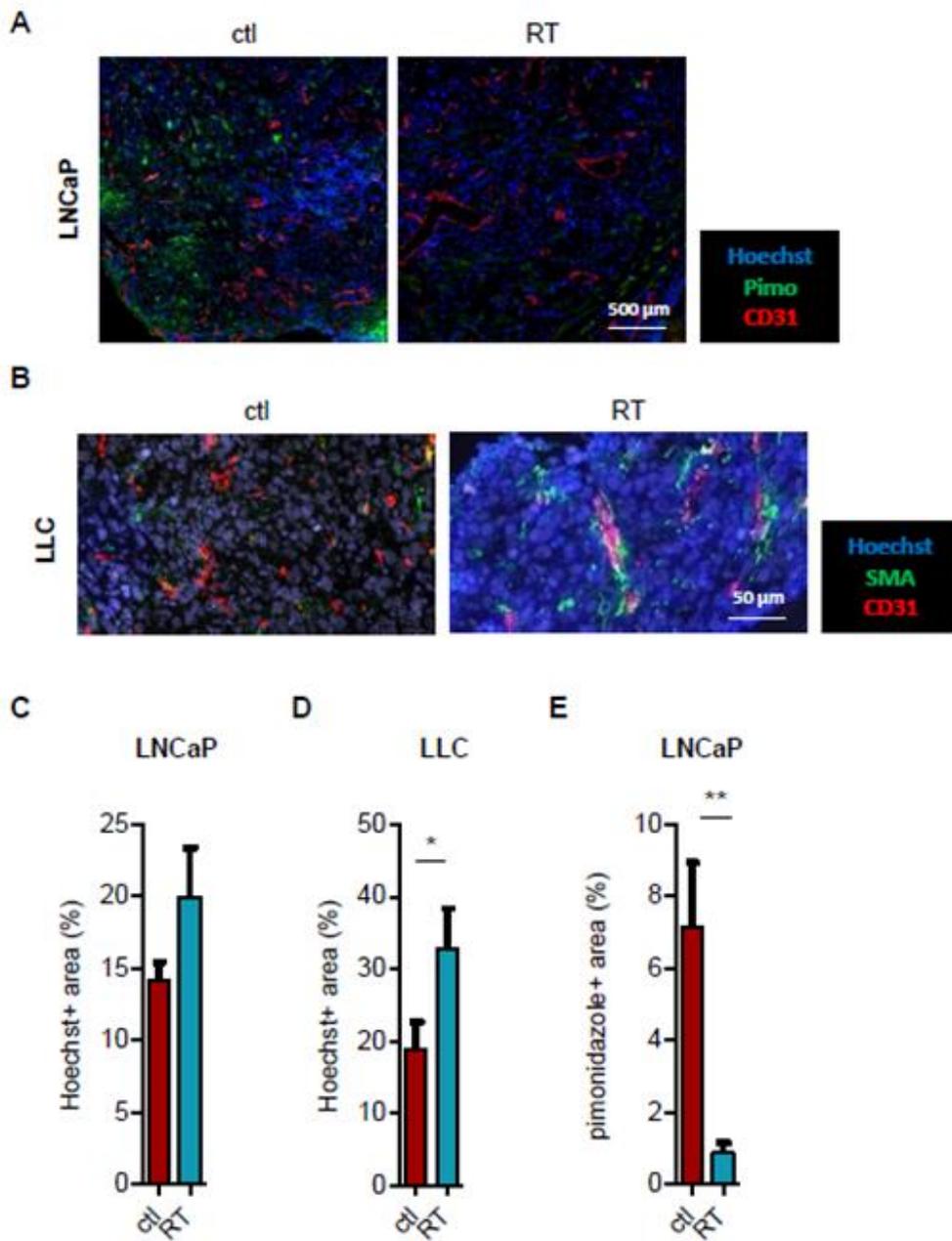
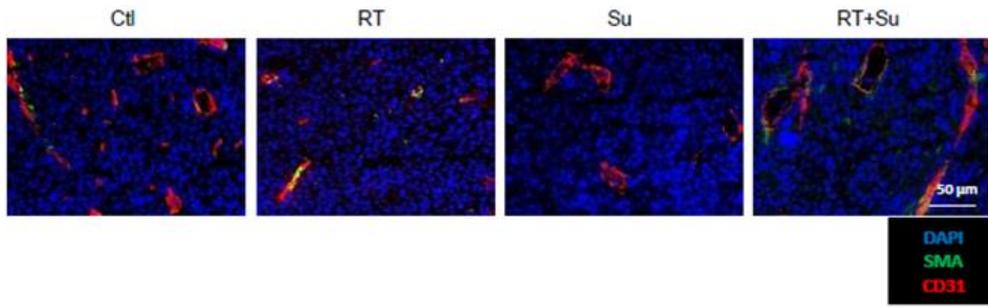
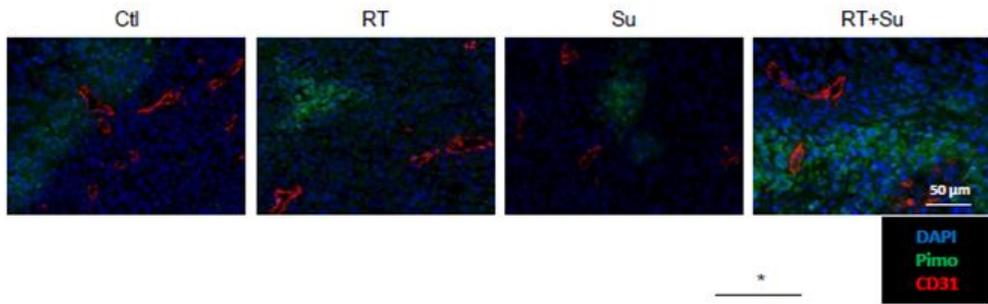


Figure 3

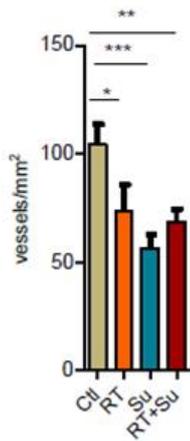
A



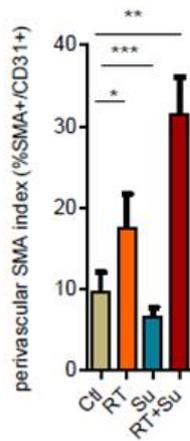
B



C



D



E

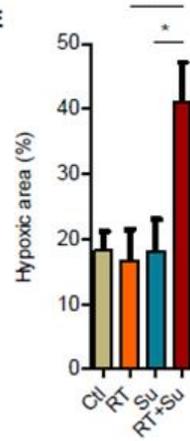


Figure 4

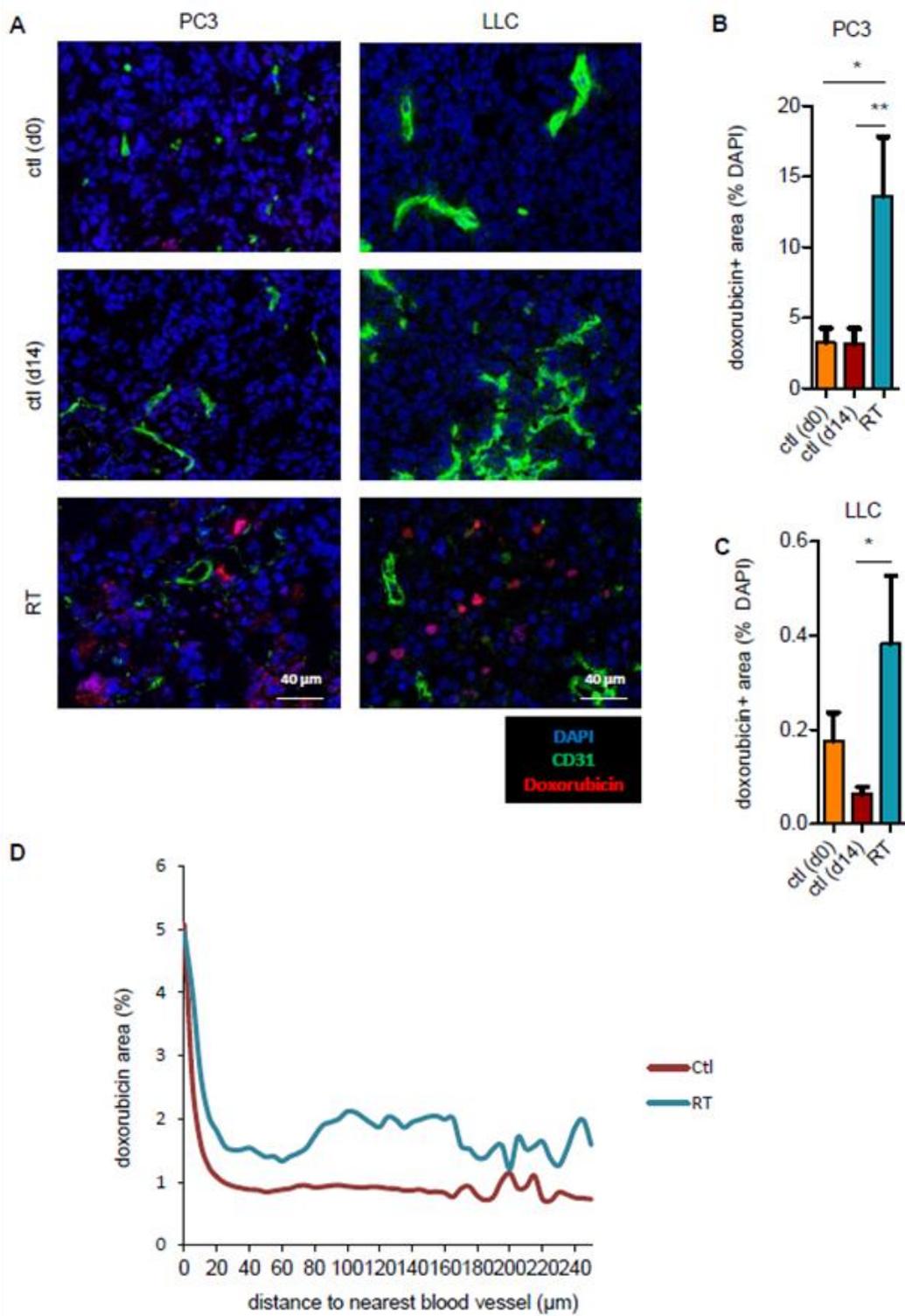


Figure 5

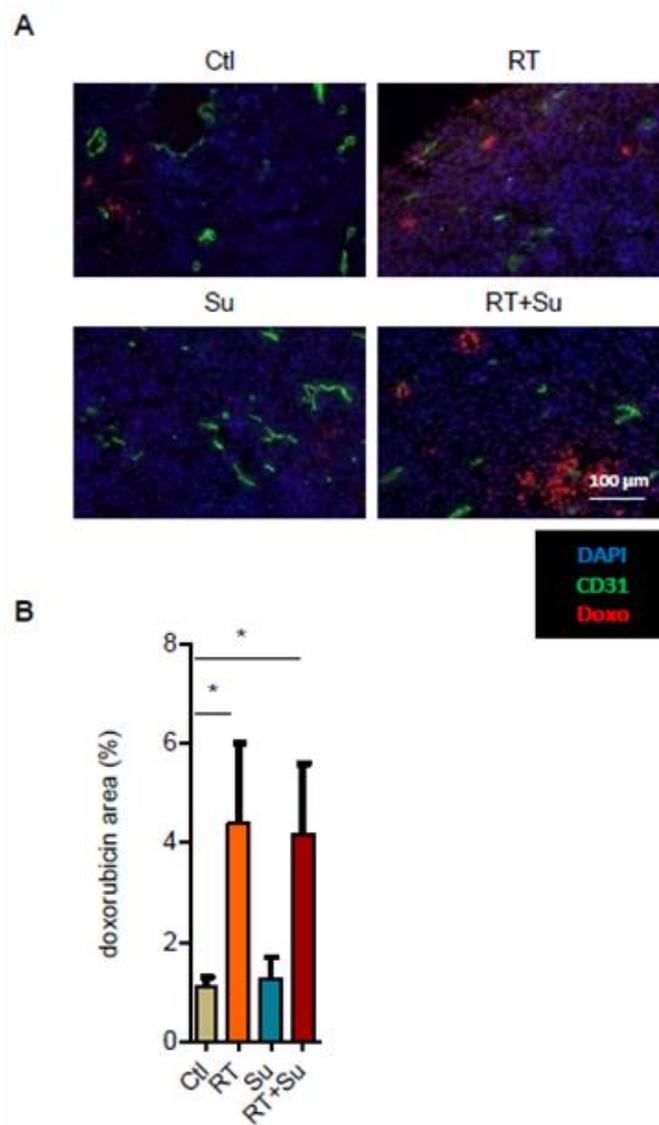
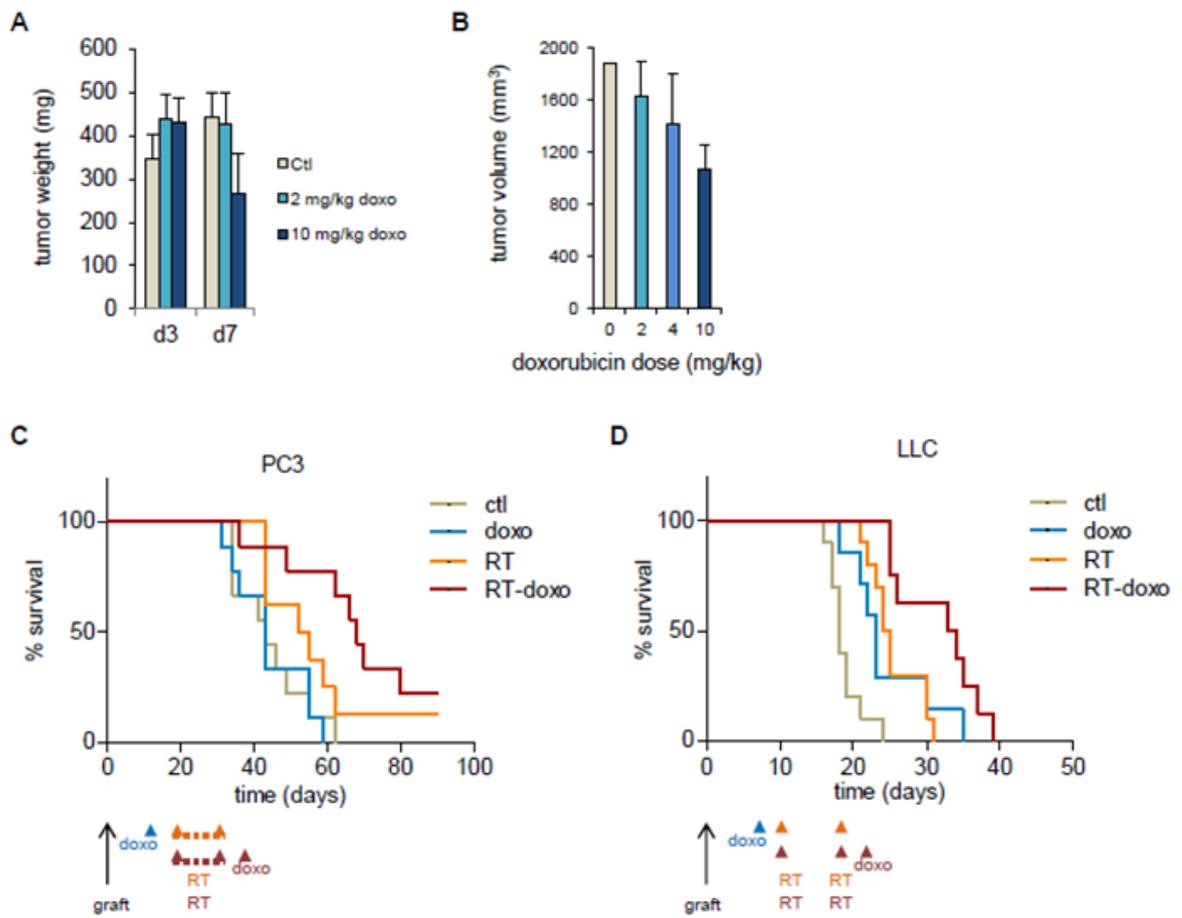


Figure 6



IMPACT DU FRACTIONNEMENT DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE TUMORAL

Mots clés : microenvironnement tumoral, radiothérapie, fractionnement, hypoxie, péricytes, cancer de prostate, cancer du poumon, stéréotaxie

Les vaisseaux tumoraux sont immatures et leur fonctionnalité est altérée, limitant l'efficacité des traitements. La radiothérapie conventionnelle (2Gy/jour) permet d'améliorer leur structure, de réduire l'hypoxie et d'améliorer la biodisponibilité de traitements concomitants. Cependant, les traitements hypofractionnés, utilisant de plus fortes doses par séance, tendent à remplacer les schémas conventionnels. Leurs conséquences sur le microenvironnement tumoral sont mal connues.

Notre objectif était de définir l'impact de différents schémas de fractionnement sur le microenvironnement vasculaire tumoral. Une échelle de fractionnement, allant de 2 à 12Gy par fraction, a été mise en œuvre sur deux modèles de cancer (prostate et poumon). Les aspects phénotypiques et fonctionnels de la vascularisation et l'efficacité anti-tumorale ont été relevés.

Nous avons pu observer une maturation vasculaire radio-induite, avec une augmentation de la couverture péricytaire et l'amélioration de la distribution de doxorubicine. Dans les deux modèles, la fonte tumorale était plus franche pour les schémas hypofractionnés. La pseudo-normalisation vasculaire était peu sensible au fractionnement, pourtant l'hypoxie était améliorée de façon dose-dépendante. L'ampleur et la durée de l'amélioration étaient plus importantes dans le modèle à croissance lente : l'hypoxie semblait dépendre autant de la cinétique de repopulation du modèle que de la qualité de l'apport vasculaire.

Nos résultats mettent en évidence l'influence mutuelle des réponses de la tumeur et du microenvironnement vasculaire à l'irradiation. Ils seront utiles pour optimiser la délivrance des traitements anticancéreux.

IMPACT OF HYPOFRACTIONATED RADIOTHERAPY SCHEDULES ON TUMOUR VASCULAR MICROENVIRONMENT

Keywords : tumour microenvironment, radiation oncology, radiotherapy fractionation, hypoxia, pericytes, prostate cancer, lung cancer, stereotactic radiotherapy

The tumour blood vessels are immature and dysfunctional, limiting the distribution and efficacy of anticancer drugs. Conventional radiotherapy (2Gy / day) improves their structure, reduces hypoxia and improves the biodistribution of concomitant treatments. However, hypofractionated radiotherapy, using higher doses per fraction, tends to replace conventional schedules. Their consequences on the tumour microenvironment are poorly understood.

Our goal was to define the impact of different fractionation schedules on the tumour vascular microenvironment. A fractionation scale, ranging from 2 to 12Gy per fraction, was implemented on two cancer models (prostate and lung). Several phenotypical and functional aspects of the vasculature and anti-tumour efficacy were studied.

A radiation-induced vascular maturation was observed, including an increased pericyte coverage and an improved distribution of doxorubicin. In both models, tumour control was better for hypofractionated schedules. Vascular pseudo-normalization was poorly sensitive to fractionation, but hypoxia was improved in a dose-dependent manner. The depth and duration of the improvement was greater in the slow-growing prostate cancer model: hypoxia seemed to depend as much on the kinetics of repopulation of the model as on the quality of the blood supply.

Our results highlight the mutual influence of tumour and vascular responses to irradiation. They will be useful to optimize the future delivery schedule of anticancer treatments.