



Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée

Johanne Seguin

► To cite this version:

Johanne Seguin. Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée. Biotechnologies. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. ⟨NNT : 2012PAO66644⟩. ⟨tel-00836310⟩

HAL Id: tel-00836310

<https://theses.hal.science/tel-00836310v1>

Submitted on 20 Jun 2013

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

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



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale: Interdisciplinaire pour le vivant (iViv)

Spécialité: Biotechnologie pour la santé

Présentée par

Johanne SEGUIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse:

**Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications
en thérapie anti-angiogénique vectorisée**

Soutenance prévue le 13/11/12

Devant le jury composé de :

M. Jean-Luc COLL,	Directeur de Recherche INSERM, Grenoble	Rapporteur
M. Olivier FERON,	Professeur, Bruxelles Woluwe	Rapporteur
M. Matthieu GERMAIN,	Responsable du département Chimie Discovery, Paris	Examineur
Mme Lori Bridal,	Directeur de recherche INSERM, Paris	Examineur
M. Guy CHABOT	Directeur de recherche INSERM, Paris	Examineur
Mme Nathalie Mignet	Chargée de recherche CNRS, Paris	Directeur de these

Unité de Pharmacologie Chimique et génétique et d'imagerie
UPCGI, UMR8151 CNRS, U1022 INSERM
4 Av. de l'observatoire,
75006 PARIS



AVANT PROPOS

J'occupe depuis décembre 2001 un poste CNRS de technicien en expérimentation animale dans le laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, dirigé par le Dr Daniel Scherman situé à la faculté de pharmacie Paris Descartes. Je travaille au sein de l'équipe dirigée par le Dr Michel Bessodes intitulée «*Conception, synthèse et validation de vecteurs pour le ciblage thérapeutique et l'imagerie*», en collaboration avec le Dr Nathalie Mignet, spécialiste en physico-chimie des vecteurs.

Cette équipe s'intéresse principalement à la vectorisation, au ciblage d'acides nucléiques ou d'agents thérapeutiques (pour la thérapie génique ou pharmaceutique) et à l'élaboration de sondes sélectives pour l'imagerie. Ce groupe allie efficacement des activités de chimie organique et de physico-chimie. Dans ce cadre, je suis responsable de l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des vecteurs non viraux de thérapie génique conçus et réalisés par les chimistes de cette équipe.

Je travaille également en forte collaboration avec le Dr G. Chabot de l'équipe 3, pour évaluer *in vitro* et *in vivo* de nouveaux agents anti-angiogénique ou antivasculaire.

Dans ce contexte, j'ai proposé à mon équipe de réaliser un doctorat sur la caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée.

PUBLICATIONS

Sur le thème de ce doctorat et présentées dans ce manuscrit

Seguin J, Nicolazzi C, Mignet N, Scherman D, Chabot GG. Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. *Tumour Biol.* 2012 Jun 7. [Epub ahead of print] PMID 22669616.

Mignet N, Seguin J, Ramos Romano M, Brullé L, Touil YS, Scherman D, Bessodes M, Chabot GG. Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. *Int. J. Pharm.* 2012, 423(1):69-76.

Publications sousmises :

Seguin J, Doan BT, Latorre Ossa H, Cengizeroglu A, Ogris M, Jugé L, Gennisson JL, Tanter M, Scherman D, Chabot GG, Mignet N. Characterization of ectopic and orthotopic colon carcinoma C26 using non invasive imaging modalities in mice. Soumis à *European Journal of Cancer*.

Seguin J, Brullé L, Boyer R, Lu YM, Ramos Romano M, Touil YS, Scherman D, Bessodes M, Mignet N, Chabot GG. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. Soumis à *Journal of Controlled Release*.

Autres publications pendant cette période (2009-2012)

Evaluation de la fisétine in vivo

Ragelle H, Crauste-Manciet S, **Seguin J**, Brossard D, Scherman D, Arnaud P, Chabot GG. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *Int J Pharm.* 2012, 427(2):452-9.

Touil YS, **Seguin J**, Scherman D, Chabot GG. Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010, 68(2):445-55.

Evaluation de l'activité antivasculaire par imagerie

Jugé L, Doan BT, **Seguin J**, Albuquerque M, Larrat B, Mignet N, Chabot GG, Scherman D, Paradis V, Vilgrain V, Van Beers BE, Sinkus R. Colon tumor growth and antivasular treatment in mice: complementary assessment with MR elastography and diffusion-weighted MR imaging. *Radiology.* 2012, 264(2):436-44.

Evaluation in vitro de molécules à visée antivasculaire ou anti-angiogénique

Arthuis M, Pontikis R, Chabot GG, **Seguin J**, Quentin L, Bourg S, Morin-Allory L, Florent JC. Synthesis and structure-activity relationships of constrained heterocyclic analogues of combretastatin A4. *Chem. Med. Chem.* 2011, 6(9):1693-705

Labruère R, Gautier B, Testud M, **Seguin J**, Lenoir C, Desbène-Finck S, Helissey P, Garbay C, Chabot GG, Vidal M, Giorgi-Renault S. Design, synthesis, and biological evaluation of the first podophyllotoxin analogues as potential vascular-disrupting agents. *Chem. Med. Chem.* 2010, 5 (12):2016-25.

Ty N, Dupeyre G, Chabot GG, **Seguin J**, Quentin L, Chiaroni A, Tillequin F, Scherman D, Michel S, Cachet X. Structure-activity relationships of indole compounds derived from combretastatin A4: synthesis and biological screening of 5-phenylpyrrolo[3,4-a]carbazole-1,3-diones as potential antivasular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45 (9), 3726-3739.

Evaluation de la biodistribution de nanoparticules ou de formes liposomales

Maldiney T, Byk G, Wattier N, **Seguin J**, Khandadash R, Bessodes M, Richard C, Scherman D. Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *Int. J. Pharm.* 2012, 423(1):102-7.

Maldiney T, Richard C, **Seguin J**, Wattier N, Bessodes M, Scherman D. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano.* 2011, 5 (2):854-862

Breton M, Leblond J, **Seguin J**, Midoux P, Scherman D, Herscovici J, Pichon C, Mignet N. Comparative gene transfer between cationic and thiourea lipoplexes. *J Gene Med.* 2010, 12 (1):45-54.

Evaluation du ciblage actif in vitro

Maldiney T, Kaikkonen MU, **Seguin J**, le Masne de Chermont Q, Bessodes M, Airene KJ, Ylä-Herttuala S, Scherman D, Richard C. In vitro targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* 2012, 23(3):472-8.

COMMUNICATIONS ORALES

Seguin J, Doan BT, Gennisson JL, Latorre Ossa H, Marchiol C , Ogris M, Scherman D, Bessodes M, Mignet N. Exploration of various imaging techniques for the characterization of colon carcinoma models. XXVIème journée du GTRV, Bruxelles, 2011.

Seguin J, Ramos M, Brullé L, Scherman D, Bessodes M, Chabot GG, Mignet N. Development of a liposomal form of the natural flavonoid fisetin and evaluation of its antitumoral activity in mice. XXVème journée du GTRV, Toulouse, 2010.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Bureau MF, **Seguin J**, Scherman D. Plateforme d'imagerie optique pour la visualisation et l'évaluation de la luminescence ou de la fluorescence chez le petit animal. 3ème Journée Scientifique de l'IMTCE, Paris, 2012.

Seguin J, Doan BT, Gennisson JL, Latorre Ossa H, Marchiol C , Ogris M, Scherman D, Bessodes M, Mignet N. Characterization of colon carcinoma models by various imaging techniques, Imagiv, Paris, 2011.

Seguin J, Marchiol C, Renault, Fradelizi F, Jugé L. Doan BT, Ogris M, Scherman D, Bessodes M, Mignet N. Mise en place et caractérisation de modèles murins de carcinome de colon CT26. 2ème Journée Scientifique de l'IMTCE «Partenariats Recherche Fondamentale-Recherche clinique», Paris, 2011.

Mignet N, **Seguin J**, Ramos Romano M, Brullé L, Scherman D, Bessodes M, Chabot GG.. Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisétine. 2ème Journée Scientifique de l'IMTCE «Partenariats Recherche Fondamentale-Recherche clinique», Paris, 2011.

Seguin J, Marchiol C, Renault, Fradelizi F, Jugé L. Doan BT, Ogris M, Scherman D, Bessodes M, Mignet N. Mise en place et caractérisation de modèles murins de carcinome de colon CT26. Journées de Rentrée de l'Ecole doctorale, Paris, 2010.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xii
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
I. LE CANCER.....	2
1. Le processus néoplasique.....	2
2. Les caractéristiques des cellules tumorales.....	3
3. Classification des cancers.....	3
4. La situation du cancer dans le monde et en France.....	5
5. Les facteurs de risques.....	7
6. Les méthodes de dépistage et de diagnostic.....	11
7. Les traitements actuels du cancer.....	17
II. L'ANGIOGENÈSE.....	27
1. Les vaisseaux sanguins.....	27
2. Les différentes voies de formation des vaisseaux.....	28
3. L'angiogenèse tumorale.....	29
4. Contexte vasculaire particulier aux tumeurs.....	33
5. Les cellules endothéliales une cible de choix.....	34
6. Les molécules d'adhésion cellulaire ayant un rôle dans l'angiogenèse.....	39
III. NANOPARTICULES ET CANCER.....	47
1. Propriétés/Avantages des nanovecteurs.....	47
2. Mécanisme d'action.....	48
3. Les différents systèmes de vectorisation.....	49
4. Les nanovecteurs sur le marché.....	53
5. Les nanovecteurs en développement clinique.....	54
IV. OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	60
CHAPITRE II : LES MODELES DE TUMEURS MURINES ET LEURS CARACTERISATIONS.....	62
I. LES MODELES PRECLINIQUES EN CANCEROLOGIE.....	63
1. Les modèles de tumeurs <i>In situ</i>	63
2. Modèles implantés.....	64
3. Apports des modèles murins.....	65
4. Choix du bon modèle.....	66
II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN POUR LE CIBLAGE TUMORAL	67
1. Objectifs des travaux.....	67
2. Caractérisation de modèles de tumeurs murines (mise au point préliminaire).....	67
3. Sélection de la lignée tumorale (Article 1).....	68

4.	Caractérisation du modèle choisi par imagerie (Article 2).....	69
III.	VASCULAR DENSITY AND ENDOTHELIAL CELL EXPRESSION OF INTEGRIN ALPHA V BETA 3 AND E-SELECTIN IN MURINE TUMOURS	71
1.	Introduction.....	72
2.	Materials and methods	73
3.	Results.....	74
4.	Discussion	80
IV.	CHARACTERIZATION OF ECTOPIC AND ORTHOTOPIC COLON CARCINOMA C26 USING NON INVASIVE IMAGING MODALITIES IN MICE.....	88
1.	Introduction.....	90
2.	Materials and Methods	91
3.	Results.....	95
4.	Discussion	103
5.	Conclusions	105
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	108
1.	La vascularisation des tumeurs	108
2.	Les intégrines $\alpha\beta 3$	109
3.	Sélectine-E	111
4.	Etude de la croissance des tumeurs côlon C26.....	113
	CHAPITRE III : APPLICATIONS THERAPEUTIQUES	122
I.	LES FLAVONOÏDES	123
1.	La structure des flavonoïdes.....	123
2.	Les sources de flavonoïdes	123
3.	Les propriétés des flavonoïdes.....	124
4.	Les propriétés antitumorales et anti-angiogéniques des flavonoïdes	124
5.	Propriétés antitumorales et anti-angiogéniques de la fisétine.....	125
II.	LA VECTORISATION DE COMPOSES LIPOPHILES.....	130
1.	Particularités des liposomes	130
2.	Composition des liposomes.....	132
3.	Paramètres d'auto-assemblage.....	133
4.	Classification des liposomes.....	134
5.	Liposomes conventionnels et liposomes furtifs.....	135
6.	Méthodes d'obtention des liposomes.....	137
III.	MISE AU POINT D'UNE FORMULATION LIPOSOMALE DE LA FISETINE ET ÉVALUATION ANTITUMORALE (RÉSUMÉ DES TRAVAUX RÉALISÉS)	141
1.	Article 3 : Optimisation d'une forme d'administration de la fisétine	141
2.	Article 4 : Validation de la forme liposomale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	142
IV.	DEVELOPMENT OF A LIPOSOMAL FORMULATION OF THE NATURAL FLAVONOID Fisetin.....	144
1.	Introduction.....	145
2.	Experimental methods	146
3.	Results and Discussion	152
4.	Acknowledgements.....	160
5.	References	161

V. LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF THE NATURAL FLAVONOID Fisetin IMPROVES BIOAVAILABILITY AND ANTITUMOR EFFICACY (ARTICLE 4).....	164
1. Introduction	166
2. Materials and methods	167
3. Results.....	171
4. Discussion	178
5. Conclusion.....	179
VI. CONCLUSIONS ET RESULTATS COMPLÉMENTAIRES	184
1. Optimisation de la formulation	184
2. Conservation des propriétés biologiques <i>in vitro</i>	186
3. Pharmacocinétique et biodistribution du liposome.....	187
4. Effet antitumoral.....	187
5. Evaluation de l'intérêt d'un ciblage des liposomes fisétine	190
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	192
REFERENCES	197
ANNEXES	216

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACS : American cancer society

AND : Acide désoxyribonucléique

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

BCR-ABL : *Breakpoint cluster region-Abelson*

bFGF : *basic Fibroblast Growth Factor*

C26 : Tumeur de côlon C26, *Colon Tumor 26*

CAIX : Anhydrase carbonique IX, *Carbonic anhydrase IX*;

CAM : Molécule d'adhésion cellulaire, *cell adhesion molecule*

CD : Cluster de différenciation cellulaire

CEA : Antigène carcinoembryonnaire, *carcinoembryonic antigen*

Cf : *Confer (latin)*, se reporter à, se référer à

Chol : Cholestérol

CPA : Cyclophosphamide

CT : *Computed tomography*

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMXAA : *Dimethyl xanthone acetic acid*

DODA : *Dioctadecyldimethylammonium chloride*

DOPC : *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

DOPE : *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*

DSPE : *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*

EAhy926 : cellules endothéliales humaines immortalisées

ECs : Cellules endothéliales, *endothelial cell*

EGFR : *Epidermal growth factor receptor*

EPC : *Egg Phosphatidylcholine*

EpCAM : Molécule d'adhésion cellulaire à l'épithélium, *Epithelial cell adhesion molecule*

EPHA3 : *Ephrin receptor A3*

EPR : Augmentation de la perméabilité et de la rétention, *Enhanced Permeability Retention*

FAA : Acide flavone-8-acétique, *flavone acetic acid*

FAP : Protéine activatrice des fibroblastes, *Fibroblast activation protein*

FDA : *Food and Drug Administration*

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes, *Fibroblast growth factor*

FGFR : Récepteur du FGF

Fiséatine : 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone

FITC : Fluorescéine Isothiocyanate

Flt : *FMS-like tyrosine kinase*

GBM : Glioblastome multi forme

GLY : Glycine

gpA33 : Glycoprotéine A33

GUV : Vésicules unilamellaire géantes, *Giant Unilamellar Vesicles*

HER : Facteur de croissance épidermique humain, *Human Epidermal growth factor Receptor*

HIF : Facteur inductible de l'hypoxie, *Hypoxia-inducible factor*

HNPCC : Cancer colorectal héréditaire non polypeux, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*

i.p. : Administration par la voie intrapéritonéale

i.v. : Administration par la voie intraveineuse

IFP : Pression des fluides interstitiels, *interstitial fluid pressure*

Ig : Immunoglobuline

IGF1R : *Insulin-like growth factor 1 receptor*

IgG : Immunoglobuline de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

INCa : Institut National du Cancer

IRM : Imagerie par résonance magnétique

Le x : Antigène Lewis X

Le y : Antigène Lewis Y

LLC : Carcinome pulmonaire de Lewis, *Lewis Lung Carcinoma*

LPS : Lipopolysaccharides

LPA : *lysophosphatic acid*

LUV : Grandes vésicules unilamellaires, *Large Unilamellar Vesicles*

mAbs : Anticorps monoclonaux, *Monoclonal antibodies*;

MMAE : *monomethylauristatin E*

MAP kinase : Protéine kinase activatrice, *Mitogen activated protein kinase*

m-CSF : Facteur stimulateur des macrophages, *Macrophage colony stimulating factor*

MEC : Matrice extracellulaire,

MLV : Vésicules multilamellaire, *Multilamellar Vesicles*

MMP : Protéines de la matrice extracellulaire, *Metalloprotease matrix*

MVD : Densité en micro-vaisseaux, *microvascular density*

NA : Non applicable

NGPE : *N-glutaryl phosphatidylethanolamine*

NCI : *National Cancer Institute*

NPs : Nanoparticules

P90G : Phospholipon® 90 G

PAF : Polypose adénomateuse familiale

PBS : Tampon phosphate, *Phosphate buffered saline*

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes, *Platelet-derived growth factor*

PDGFR : Récepteur du PDGF, *Platelet-derived growth factor receptor*;

PDI : Index de polydispersité, *Polydispersity Index*

PEG : Polyéthylène glycol

PSMA : Antigène spécifique de la membrane prostatique, *Prostate-specific membrane antigen*

RANKL : *Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*

RES : système réticulo-endothélial, *reticuloendothelial system*

RGD : Peptide (arginine-glycine-acide aspartique)

s.c : Administration par la voie sous-cutanée

SDS : Sodium dodecyl sulphate;

SLE_x : Sialyl lewis x

SLE_a : Sialyl lewis a

SPECT : *Single-photon emission computed tomography*

TAG-72 : Tumeur-associated glycoprotein 72

TEM : Microscopie électronique à transmission, *Transmission electron microscopy*

TEP : Tomographie par émission de positon

TRAILR : *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor*

US : Ultrasons

UV : Ultraviolet

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR : Récepteur du VEGF

VEGFR2 : Récepteur 2 du VEGF

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure I.1 :	Division cellulaire d'une cellule normale et d'une cellule tumorale	2
Figure I.2 :	Illustration des propriétés des cellules tumorales	3
Figure I.3 :	Le processus malin comparé au processus bénin	4
Figure I.4 :	Les différents types de cancer	5
Figure I.5 :	Estimation de l'incidence et de la mortalité	6
Tableau I.1 :	Les statistiques du cancer en 2008	7
Tableau I.2 :	Tumeurs induites suite à la consommation d'alcool et de tabac	8
Tableau I.3 :	Tumeurs pouvant être induites par une exposition au soleil et par les UV	9
Figure I.6 :	Exemples d'imagerie par rayon X	12
Figure I.7 :	Exemples d'utilisation des ultrasons en clinique	13
Figure I.8 :	Imagerie par résonance magnétique	14
Figure I.9 :	Imagerie SPECT	15
Figure I.10 :	Exemples d'images PET scan	16
Tableau I.4 :	Comparaison de la sensibilité des différentes modalités d'imagerie	17
Tableau I.5 :	Exemple de cancers traités par radiation	19
Figure I.11 :	Sites d'action des principaux agents antitumoraux cytostatiques	20
Tableau I.6 :	Petites molécules inhibitrices	23
Tableau I.7 :	Anticorps monoclonaux	25
Figure I.12 :	Les différents types d'endothélium vasculaire	27
Figure I. 13:	Structure des vaisseaux sanguins	28
Figure I.14 :	La formation des vaisseaux sanguins	29
Figure I.15 :	« Switch » angiogénique	30
Figure I.16:	Angiogenèse par bourgeonnement ou intussusception	30
Figure I.17 :	L'angiogenèse par bourgeonnement	31
Figure I.18 :	Différences entre l'endothélium sain et l'endothélium tumoral	32
Figure I.19 :	Différence entre le réseau vasculaire d'un tissu sain et celui d'une tumeur	33
Figure I.20 :	Rôle prépondérant de l'angiogenèse dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique	35
Figure I.21 :	L'approche anti-angiogénique et l'approche antivasculaire	36
Figure I.22 :	Différences entre les agents antivasculaires et les agents anti-angiogéniques	36
Tableau I.8 :	Agents antivasculaires en développement clinique	37
Figure I.23 :	Mode d'action de la combrétastatine	38
Tableau I.9 :	Anti-angiogénique en développement préclinique et clinique	39

Figure I.24 :	Intégrines : structure et ligands endogènes.	40
Figure I.25 :	Implication des intégrines dans l'angiogenèse et la progression tumorale	41
Tableau I.10 :	Essais cliniques sur des molécules ciblant les intégrines	43
Tableau I.11 :	Essai cliniques en cours sur l'utilisation du ciblage des intégrines pour la visualisation de foyers tumoraux	43
Figure I.26 :	Représentation schématique de la diffusion métastatique via la sélectine-E	45
Tableau I.12 :	Systèmes ciblant la sélectine-E, études précliniques	46
Figure I.27 :	Avantages de l'utilisation de formulations pour la thérapie anticancéreuse	47
Figure I.28 :	Le ciblage passif et le ciblage actif des tumeurs	49
Tableau I.13 :	Les différents types de nanovecteurs	52
Tableau I.14 :	Formes liposomales commerciales	53
Tableau I.15 :	Liposomes en développement clinique	55
Tableau I.16 :	Exemple de nanomédicaments pour le cancer en développement clinique	56
Tableau I.17 :	Formulation de la doxorubicine en cours d'essai clinique	57
Tableau I.18 :	Formulation du docetaxel en cours d'essai clinique	58
Tableau I.19 :	Exemples de formulations du paclitaxel	59
Figure II.1 :	Représentation schématique des différentes catégories de modèles de cancer utilisés en préclinique	63
Figure II.2 :	Mise au point du marquage immuno-histochimique sur un modèle d'inflammation aigüe induite au LPS	68
Figure II.3 :	Vascularisation des tumeurs C26 5 jours après implantation	109
Figure II. 4 :	Evaluation de l'expression de la fraction $\beta 3$ des intégrines par l'anticorps CD61 par immunohistochimie	110
Figure II.5 :	Visualisation d'une tumeur de côlon C26 implantée en orthotopique 24 h après injection d'une sonde fluorescente ciblant les intégrines	111
Figure II.6 :	Cinétique d'expression de la sélectine E sur le modèle côlon	112
Figure II.7 :	Suivi de la croissance tumorale d'un carcinome de côlon C26 après injection transanale-rectal	115
Figure II.8 :	Image d'une souris, porteuse d'une tumeur orthotopique C26, 24h après injection de la sonde MMPsens	116
Figure II.9 :	Image de la perfusion des tumeurs C26 implantées en ectopique	117
Figure II.10 :	Image échographique de la tumeur ectopique C26	118
Figure II.11 :	Visualisation du flux sanguin par doppler de la tumeur C26	119
Figure II.12 :	Images représentatives d'une tumeur MeWo	119
Figure II.13 :	Imagerie ultrasonore après l'injection de microbulles	120
Figure II.14 :	Suivi de l'élasticité par échographie	121
Figure III.1 :	Les principaux groupes de flavonoïdes	123

Tableau III.1 :	Quelques sources de flavonoïdes	124
Tableau III.2 :	Lignées cancéreuse sur lesquelles une activité des flavonoïdes a été rapportée	125
Tableau III.3 :	Flavonoïdes induisant une modification de la morphologie des cellules endothéliales	126
Figure III.2 :	Structure chimique de la fisétine	126
Figure III.3 :	Effet morphologique observé sur les cellules endothéliales	127
Figure III.4 :	Effet anti-angiogénique de la fisétine	128
Figure III.5 :	Activité antitumorale de la fisétine.	129
Figure III.6 :	Localisation des principes actifs au sein des particules liposomales	131
Figure III.7 :	Structure des phospholipides	132
Figure III.8 :	Positionnement du cholestérol dans une bicouche	133
Tableau III.4 :	Disposition des phospholipides en fonction de leur composition	134
Figure III.9 :	Classification des liposomes d'après leur taille et le nombre de bicouches	135
Figure III.10 :	Mécanisme proposé de la capture macrophagique et hépatique des liposomes conventionnels	136
Figure III.11 :	Liposome de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération	137
Figure III.6 :	Formation de liposomes par injection éthanolique	138
Figure III.13 :	Formation de liposomes par la méthode d'hydratation de film lipidique	139
Figure III.14 :	Préparation des liposomes par méthode physique	140
Figure III.7 :	Détermination de l'efficacité du traitement fisétine sur la lignée tumorale de côlon 26	189
Tableau III.4 :	Biodistribution 2h après injection i.p. du liposome fisétine (LF) et du liposome fisétine-RGD (LF-RGD)	190

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I.	LE CANCER.....	2
1.	Le processus néoplasique	2
2.	Les caractéristiques des cellules tumorales	3
3.	Classification des cancers	3
4.	La situation du cancer dans le monde et en France	5
5.	Les facteurs de risques.....	7
6.	Les méthodes de dépistage et de diagnostic.....	11
7.	Les traitements actuels du cancer	17
II.	L'ANGIOGENÈSE.....	27
1.	Les vaisseaux sanguins.....	27
2.	Les différentes voies de formation des vaisseaux	28
3.	L'angiogenèse tumorale	29
4.	Contexte vasculaire particulier aux tumeurs	33
5.	Les cellules endothéliales une cible de choix	34
6.	Les molécules d'adhésion cellulaire ayant un rôle dans l'angiogenèse	39
III.	NANOPARTICULES ET CANCER	47
1.	Propriétés/Avantages des nanovecteurs	47
2.	Mécanisme d'action	48
3.	Les différents systèmes de vectorisation	49
4.	Les nanovecteurs sur le marché.....	53
5.	Les nanovecteurs en développement clinique	54
IV.	OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	60

I. LE CANCER

Selon l'American Cancer Society, le cancer est défini comme un ensemble de maladies caractérisées par une prolifération incontrôlée et la propagation de cellules anormales [American Cancer Society (ACS), 2011].

1. Le processus néoplasique

Composante de base de tous les êtres vivants, la cellule est le siège du processus de cancérisation. Une cellule à l'état normal possède un processus de division cellulaire contrôlé. Lorsqu'une mutation apparaît dans son patrimoine génétique une cellule normale va entrer en apoptose (Figure I.1-A). Lorsqu'une cellule échappe à différentes mutations, sans réparation, ni passage en phase apoptotique alors il y aura une croissance incontrôlée et l'évolution vers une tumeur maligne (Figure I.1-B).

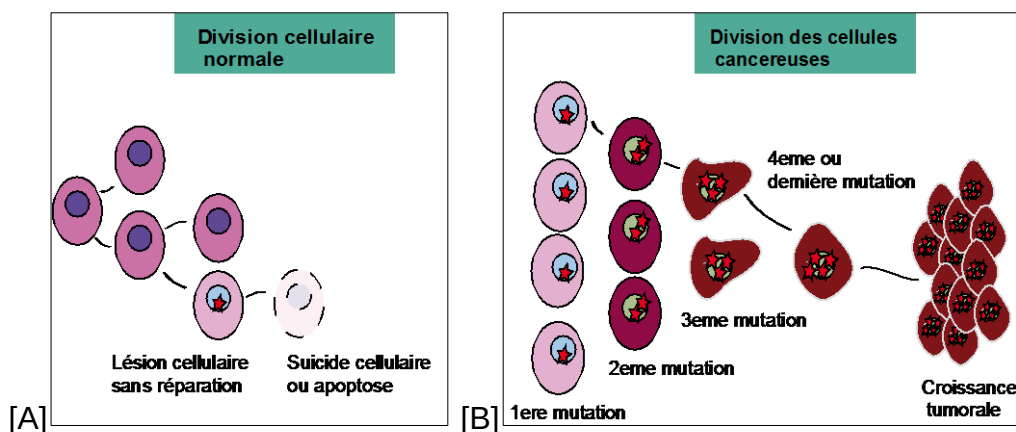


Figure I.1 : Division cellulaire d'une cellule normale A et d'une cellule tumorale B [National Cancer Institute (NCI) <http://www.cancer.gov/>]

Les scientifiques ont identifié plus de 300 gènes qui peuvent jouer un rôle dans le développement tumoral s'ils sont altérés. Ces altérations peuvent être de différents types : mutation dans la séquence des gènes, altération du nombre de chromosomes, translocation chromosomique et amplification de gènes. Les modifications observées peuvent se produire dans différentes classes de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de la cellule, notamment les oncogènes (gènes promoteurs de croissance), les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes régulateurs de l'apoptose ainsi que les gènes réparateurs des dommages de l'ADN. Par exemple une altération au sein des oncogènes peut induire un signal de division incontrôlée et donc une croissance cellulaire accrue. Si une mutation intervient au sein des gènes suppresseurs de tumeurs ayant pour rôle de limiter la division

cellulaire, les cellules possédant cette mutation continuent de proliférer sans réparation de leur ADN ni entrée en apoptose.

2. Les caractéristiques des cellules tumorales

Hanahan et Weinberg en 2000 ont identifié 6 caractéristiques permettant de distinguer les cellules tumorales des cellules saines (Figure I.) [Hanahan et Weinberg, 2000]. Les cellules tumorales ont ainsi la capacité d'échapper aux facteurs inhibiteurs de croissance, de résister à l'apoptose, d'induire un signal prolifératif, possèdent une immortalité répliquative et peuvent induire l'angiogénèse favorisant ainsi la dissémination métastatique.

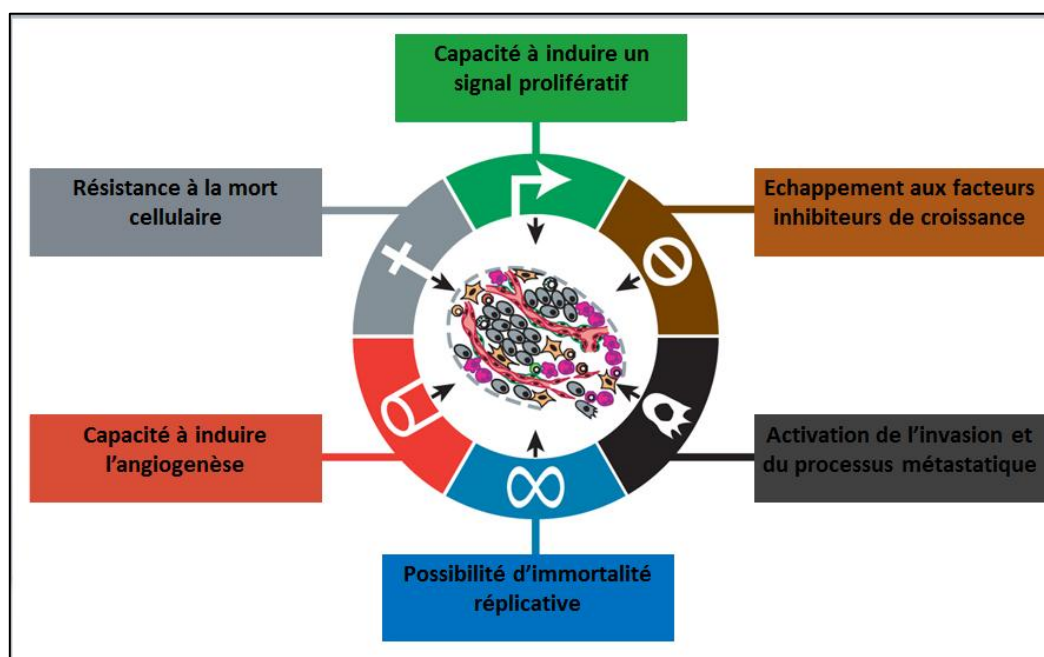


Figure I.2 : Illustration des propriétés des cellules tumorales [Hanahan *et al.*, 2011].

Nous allons dans la suite de ce manuscrit (Partie II de ce chapitre) détailler plus particulièrement le processus angiogénique. En effet, l'angiogénèse est une étape clé qui permet à la tumeur d'atteindre chez l'Homme une taille supérieure à ~1-2 mm de diamètre [Kerbel, 2000]. Par conséquent, ce processus est une cible de choix pour lutter contre la croissance tumorale.

3. Classification des cancers

3.1 Les tumeurs malignes et les tumeurs bénignes

Les tumeurs peuvent être classées en deux catégories : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes ou cancers (Figure I.). Les tumeurs bénignes sont entourées

d'une capsule, qui les rend non invasives. Elles ont une croissance limitée et sont rarement mortelles. En revanche, dans le cas des tumeurs malignes, les cellules ont la capacité de donner des foyers tumoraux secondaires (métastases) situés à distance de la tumeur primaire. De plus, les tumeurs malignes manifestent souvent une plus grande agressivité locale en termes d'envahissement et de destruction vis-à-vis des tissus environnants.

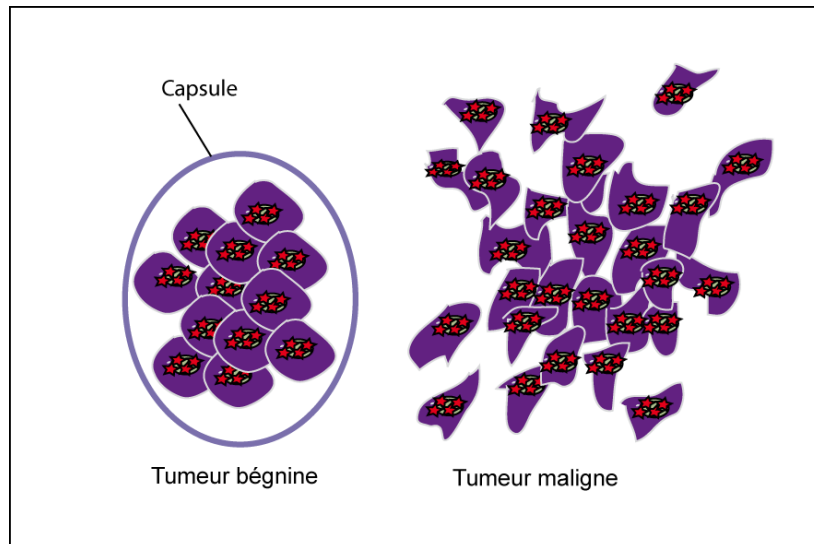


Figure I.3 : Le processus malin comparé au processus bénin [NCI, <http://www.cancer.gov/>].

3.2 Les différents types de cancers

Les cancers peuvent être classés en fonction du type de tissu affecté (Figure I.). Les carcinomes sont les cancers les plus courants. Ils proviennent des cellules qui recouvrent les surfaces internes et externes du corps c'est-à-dire les tissus épithéliaux comme le poumon et le côlon. Les sarcomes sont des cancers qui touchent les tissus conjonctifs c'est-à-dire les tissus de soutien de la structure de l'organisme comme les tissus osseux, cartilagineux, musculaires, adipeux et vasculaires. L'incidence de ce type de cancer est rare. Les lymphomes touchent les tissus hématopoïétiques qui regroupent les ganglions lymphatiques et les tissus du système immunitaire. Et enfin les leucémies concernent les tissus de la moelle osseuse responsable de la production des globules blancs.

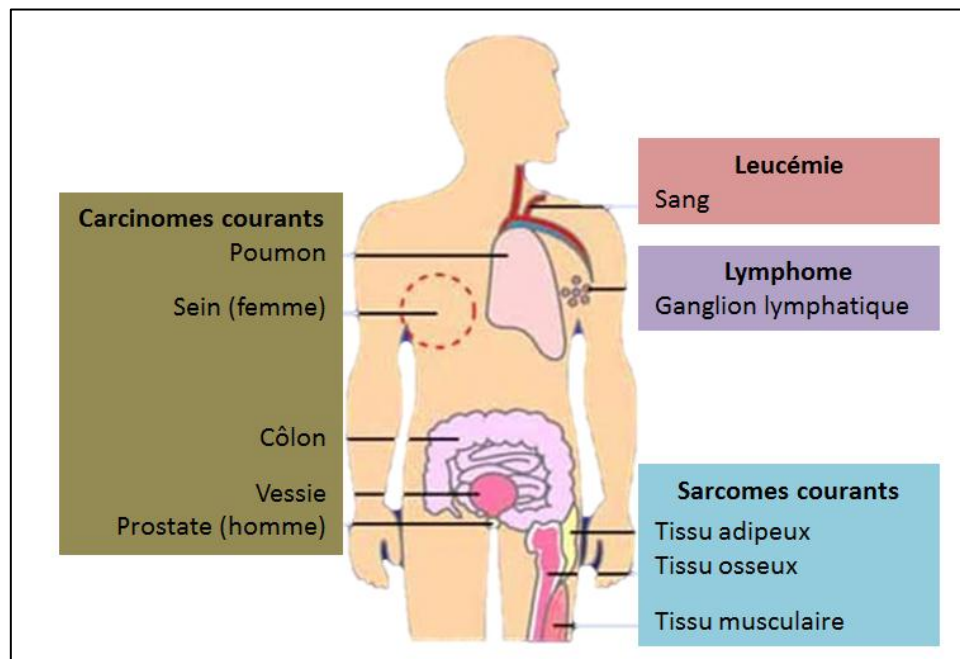


Figure I.4 : Les différents types de cancer [NCI, <http://www.cancer.gov/>].

4. La situation du cancer dans le monde et en France

4.1 Le cancer au niveau mondial

Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires avec 7,424 millions de morts en 2004. Pour les pays en voie de développement cela constitue 2,154 millions de morts soit 26,6% des causes de décès contre 5,255 millions soit 10,4 % pour les pays développés [Jemal *et al.*, 2011].

Chez l'homme, les 3 cancers les plus fréquents sont le cancer du poumon et des bronches, de la prostate et le cancer colorectal avec respectivement 1 095 200, 903 500, et 663 600 nouveaux cas estimés en 2011 (Figure I.5). Pour la femme, il s'agit du cancer du sein, du cancer colorectal et du cancer du col de l'utérus avec respectivement 1 383 500, 570 000 et 529 800 nouveaux cas estimés en 2011. Les cancers les plus mortels chez l'homme sont le cancer du poumon et des bronches avec 951 000 cas, le cancer du foie avec 478 300 cas et le cancer de l'estomac avec 464 400 cas estimés en 2008. Pour la femme les cancers les plus mortels sont ceux du sein, du poumon et des bronches et le cancer colorectal avec respectivement 458 400, 427 400 et 288 100 morts estimés en 2008 (Figure I.)

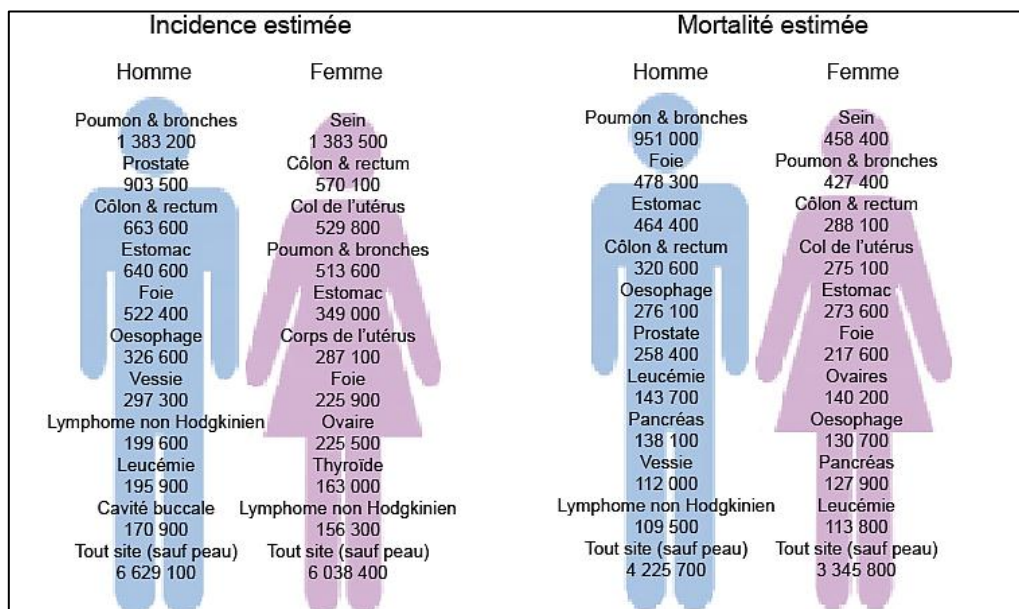


Figure I.5 : Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer dans le monde [GLOBOCAN 2008, <http://globocan.iarc.fr/> ; Jemal et al., 2011]

4.2 Le cancer en France

En France, le nombre de nouveaux cas de cancer estimé en 2011 est de 365 500 soit 207 000 pour les hommes et 158 500 pour les femmes. L'âge moyen du patient lors de son diagnostic en 2005 est de 67 ans pour l'homme et de 64 ans pour la femme. La survie relative à 5 ans des patients diagnostiqués entre 1989 et 1997 était de 52 %, soit 44 % chez l'homme et 63 % chez la femme. En termes de mortalité 147 500 décès liés au cancer sont estimés en 2011. Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme (84 500 morts) et la seconde chez la femme (63 000 morts) sur la période 2004-2008 [Epidémiologie des cancers - Données essentielles en France métropolitaine- INCa Institut National du Cancer - <http://lesdonnees.e-cancer.fr/>].

FRANCE (METROPOLITAINE)	Homme	Femme	Sexes confondus
Population (x1000)	30157	31878	62036
Nombre de nouveaux cas / an (x1000)	188,9	143,8	332,7
Nombre de nouveaux cas / an pour 10 000 personnes	360,6	254,9	300,4
Risque d'avoir un cancer avant 75 ans (%)	35,6	24,5	29,9
Nombre de morts par cancer/ an (x1000)	84,9	60,7	145,5
Nombre de morts / an pour 10 000 personnes	144,4	77,5	107,3
Risque de mort par cancer avant 75 ans (%)	14,7	7,8	11,1
Cas de prévalence à 5 ans, population adulte (x1000)	552,0	465,1	1017,1
Nombre de cas estimés / an pour 10 000 personnes	2269,9	1768,1	2009,2
5 cancers les plus fréquents			
(taux défini par le nombre total de cas)	Prostate	Sein	Prostate
	Poumon	Colorectal	Sein
	Colorectal	Poumon	Colorectal
	Vessie	Thyroïde	Poumon
	Reins	Col de l'utérus	Vessie

Tableau I.1 : Les statistiques du cancer en 2008 [GLOBOCAN 2008, <http://globocan.iarc.fr/> ; Ferlay et al., 2010 ; Bray et al., 2012]

5. Les facteurs de risques

Parmi les risques de cancer on distingue les facteurs comportementaux, les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques.

5.1 Les facteurs comportementaux

Il existe différents facteurs de risques de décès par cancer comme le tabac, l'alcool et la nutrition. Ces facteurs sont de type comportemental sur lesquels il est possible d'agir pour diminuer l'incidence des cancers. Ci-dessous seront développés les deux facteurs de risques les plus importants : le tabac et l'alcool.

○ *La consommation de tabac*

En France, le nombre de décès liés au tabac est estimé à 73 000, dont 44 000 par cancer [Hill, 2012]. Le tabagisme est impliqué dans les cancers du poumon mais également des voies aérodigestives supérieures (bouche, larynx, pharynx, œsophage), de la vessie et du pancréas. Il serait aussi en cause dans les cancers des voies urinaires et du rein, de l'estomac, du col de l'utérus et dans certains cas de leucémies (Tableau I.2). La fumée de cigarette est un mélange complexe qui produit plus de 4000 composés chimiques dont 60 sont connus pour induire des cancers. Quelques-unes de ces substances causent des maladies des poumons et du cœur et chaque substance a la capacité d'induire la mort. La fumée de tabac contient des carcinogènes comme le benzène, le formaldéhyde, le méthanol, l'acétylène et l'ammoniaque [American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*, 2012, <http://www.cancer.org/>].

○ La consommation d'alcool

De nombreux adultes (~2 milliards) consomment des boissons alcoolisées régulièrement ce qui correspond à une consommation quotidienne moyenne de 13 g d'éthanol soit environ un verre [Secretan *et al.*, 2009]. Le risque dépend de la quantité et non du type d'alcool ingéré. Sa consommation augmente le risque des cancers des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage, du côlon-rectum, du sein et du foie (Tableau I.2). Lors de la consommation d'alcool, les principaux cancérrogènes mis en cause sont l'acétaldéhyde (principal métabolite) et les radicaux libres produits lors de sa dégradation qui peuvent induire des cancers dans différents sites [Institut National du Cancer (INCa), « Alcool et risque de cancers. État des lieux des données scientifiques et recommandations de santé publique », 2007]. De plus l'acétaldéhyde est un composé génotoxique qui est détoxifié par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'allèle variant ALDH2*2, qui code pour une protéine inactive est prévalent (de plus de 30 %) dans les populations d'Asie de l'est. Les porteurs hétérozygotes, qui ont environ 10 % activité enzymatique, accumulent l'acétaldéhyde et ont un très haut risque de cancer relatif à l'alcool au niveau de l'œsophage et de la tête et du cou comparé aux individus qui possèdent l'allèle commun [Yokoyama et Omori, 2005]. Mis à part le rôle des produits de dégradation de l'alcool dans le processus cancérigène, sa consommation induit également des déficits nutritionnels (folates, vitamines) qui favorisent la cancérogenèse.

	Sites tumoraux pour lesquels le risque de cancer est prouvé	Sites tumoraux pour lequel il y a une présomption de risque de cancer
Consommation de tabac	Cavité orale, pharynx, œsophage (adénocarcinome, carcinome des cellules squameuse), estomac, côlon, rectum, foie, pancréas, cavité nasale, sinus paranasaux, larynx, poumon, col de l'utérus, ovaire (mucineuse), vessie, reins (corps, pelvis), uretère, moelle osseuse (leucémie myéloïde)	Cancer du sein, endomètre (post - ménopause), thyroïde
Consommation d'alcool	Cavité orale, pharynx, larynx, œsophage, foie, côlon, rectum, cancer du sein	Pancréas, reins

Tableau I.2 : Tumeurs induites suite à la consommation d'alcool et de tabac d'après [Secretan *et al.*, 2009].

5.2 Les facteurs environnementaux

Il existe des carcinogènes de type environnementaux qui sont à l'origine des cancers ou qui contribuent à leur développement. On distingue les carcinogènes de type **physique** tels que les rayons ultraviolet (UV), les carcinogènes **viraux ou infectieux** comme par exemple le papillomavirus humain et les carcinogènes de type

chimique qui sont liés à l'exposition à des pollutions sur son lieu de travail ou au sein de son habitation.

Si on prend l'exemple de l'exposition aux rayons UV, les radiations solaires sont la principale source d'exposition humaine aux rayons ultraviolets. Des études épidémiologiques ont établi une relation entre l'exposition aux radiations solaires et la majorité des cancers de la peau. L'exposition aux radiations solaires induit une mutation spécifique (transformation de cytidine en thymidine) qui provoque la formation de dimère de cyclobutane pyrimidine dans l'ADN [El Ghissassi *et al.*, 2009]. Chez l'humain cette mutation a été observée dans le gène TP53 dans le cas de kératose solaire précancéreuse et dans le cas de tumeurs malignes de la peau [Agar *et al.*, 2004]. L'utilisation de cabines de bronzage peut également augmenter le risque de cancer de la peau et des yeux (Tableau I.3).

Type de radiations	Populations majoritairement étudiées	Sites et types de tumeurs
Radiations solaires	Population générale	Peau (carcinomes des cellules basales, carcinomes des cellules squameuses, mélanomes)
UV (cabines de bronzage)	Population générale	Peau (mélanomes), yeux (mélanomes, en particulier du corps ciliaire et de la choroïde)

Tableau I.3 : Tumeurs pouvant être induites par une exposition au soleil et par les UV [El Ghissassi *et al.*, 2009]

5.3 Les facteurs génétiques

Il n'est pas rare de trouver plusieurs cas de cancer au sein d'une même famille. Souvent les membres d'une même famille ont des facteurs de risques en commun comme le tabac ou l'environnement, mais dans certains cas, le cancer est causé par une anomalie génétique transmise de génération en génération. Seulement 5 à 10 % des cancers ont une cause génétique [ACS, <http://www.cancer.org/>]. Parmi les cancers qui peuvent avoir une cause génétique nous allons développer à titre d'exemple le cas du cancer du sein et du cancer du côlon qui sont des cancers où l'implication génétique est la mieux documentée.

○ *Le cancer du sein :*

Le cancer du sein peut être causé par différents gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, augmentent significativement le risque de cancer. Cependant, seulement 2 gènes BRCA1 et BRCA2 sont clairement associés aux formes héréditaires du cancer du sein. Il a été observé que BRCA1 et BRCA2 étaient responsables du maintien de

l'intégrité génomique et des réparations de l'ADN. Depuis la découverte de l'implication de ces deux gènes dans la carcinogénèse, la recherche de mutations sur ces deux gènes a été intégrée aux pratiques cliniques en oncologie. Mais il est important de noter que le risque de développer un cancer n'est pas le même chez tous les porteurs de mutation de BRCA1 ou de BRCA2, car ce risque peut être influencé par l'hétérogénéité allélique, les modifications de gènes et les cofacteurs hormonaux et environnementaux [Narod et Foulkes, 2004].

- *Le cancer du côlon :*

Une des causes de cancer du côlon est la maladie appelée la polypose adénomateuse familiale (PAF). Cette maladie de transmission autosomique dominante se manifeste par le développement d'une centaine de polypes bénins sur le côlon et le rectum dès l'adolescence. De par leur nombre élevé, le risque que l'un d'entre eux devienne malin s'accroît. La PAF est due dans la majorité des cas (8 cas /10) à une mutation du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), localisé sur le chromosome 5. Ce gène suppresseur de tumeur une fois muté induira la production d'une protéine APC non fonctionnelle et le contrôle de la croissance cellulaire ne sera plus assuré. Des tests pour détecter la mutation APC sont disponibles et effectués chez toute personne à risque dès l'âge de 12 ans. Si la PAF est diagnostiquée tôt, une chirurgie ablative du côlon est souvent préconisée pour prévenir le cancer avant son développement. Si la PAF n'est pas traitée par cette chirurgie, dite prophylactique, le risque de développer un cancer avant l'âge de 40 ans est presque de 100 % pour une personne atteinte de cette affection. La PAF est une maladie rare, elle n'est à l'origine chaque année que d'un pourcent des cancers colorectaux [©La polypose adénomateuse familiale, INCa 2011, www.e-cancer.fr].

Un autre facteur de risque de cancer colorectal est la maladie appelée syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Cette maladie est une affection génétique, qui induit la formation de polypes dans la paroi du côlon en nombre plus restreint que la PAF. Cette maladie est causée par la mutation d'un des gènes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, ou PMS2) responsable de la production des enzymes réparatrices de l'ADN. Le syndrome de Lynch est rare, il ne représente que 3 % de tous les cancers colorectaux. Les personnes atteintes doivent se faire suivre régulièrement à partir de l'âge de 20 ans. De plus, il est possible qu'une personne atteinte d'un syndrome de Lynch développe des polypes dans d'autres sites que le côlon.

6. Les méthodes de dépistage et de diagnostic

Une observation directe, ou assistée d'un appareil de visualisation, est la méthode de détection la plus courante. En effet, il est aisé de détecter des lésions sur la peau, la rétine, les lèvres, la bouche, le larynx et le col externe de l'utérus. La deuxième méthode de détection couramment utilisée est la palpation pour rechercher des masses, nodules, ou tumeurs localisés par exemple au niveau du sein, de la bouche, des glandes salivaires ou de la thyroïde. La détection des cancers internes requiert des procédures plus sophistiquées comme l'endoscopie, les rayons X, l'imagerie par résonance magnétique ou les ultrasons. Des tests de laboratoire existent également pour détecter des cancers particuliers, ces examens sont développés ci-après.

6.1 Moyens de prévention et de détection précoce

Certains types de cancer peuvent être détectés avant l'apparition de symptômes. Ce dépistage peut permettre aux médecins de trouver et de traiter certains types de cancer précocement. Généralement, plus le cancer est détecté tôt plus il est facile à traiter. Par exemple, pour la détection de cancer du sein, la mammographie, imagerie par rayons X, est le meilleur outil dont les praticiens disposent pour repérer un cancer du sein de manière précoce.

Pour le cancer du col de l'utérus, un frottis cervico-utérin est utilisé afin d'observer des cellules pré-cancéreuses. Les cellules sont examinées afin de détecter des changements éventuellement induits par la présence de papilloma virus (HPV, human papilloma virus), un des risques les plus importants de cancer de l'utérus.

En ce qui concerne le cancer colorectal, un certain nombre de tests existent pour détecter la présence de polypes, de cancer ou tout autre problème du côlon ou du rectum. Le test Hémocult II permet de détecter la présence de sang dans les selles, indiquant la présence éventuelle de polypes et de cancérisation. Si ce test est positif, une coloscopie sera nécessaire pour trouver l'origine du saignement. La coloscopie consiste à introduire un endoscope par l'anus du patient afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies du côlon. Au cours de cet examen il est possible de réaliser des biopsies ainsi que dans certains cas l'ablation de polypes.

6.2 Les techniques d'imagerie du cancer

Il existe de nos jours six modalités d'imagerie disponibles pour diagnostiquer et caractériser les cancers chez l'homme. Les rayons X (radiographie et tomodensitométrie), CT (*computed tomography*), les ultrasons (US), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), le SPECT (*single-photon emission computed tomography*), la TEP (tomographie par émission de positon), et l'imagerie optique. Parmi ces techniques, 4 permettent d'obtenir une image en 3 dimensions au sein des tissus profonds de l'organisme (CT, IRM, SPECT, and TEP) [Frangioni, 2008].

○ L'imagerie par rayons X

L'imagerie par rayons X est probablement la technique d'imagerie la plus connue. Les images produites par rayons X sont dues aux différences de propriétés d'absorption des tissus. Avec ce type d'imagerie, les os absorbant fortement les rayons X, apparaîtront en blanc, les graisses et autres tissus mous, absorbant moins les rayons apparaîtront en gris, tandis que l'air apparaîtra en noir.

L'application la plus connue de la radiographie est la visualisation de fractures mais elle est également utilisée pour le diagnostic de cancers. Par exemple, la radiographie pulmonaire et la mammographie sont utilisées pour détecter précocement ou visualiser la dissémination d'un cancer dans les poumons ou dans l'aire thoracique. La mammographie utilise les rayons X pour visualiser une tumeur ou sa suspicion dans le sein [NCI, <http://www.cancer.gov/>] (Figure I.6.-A).

Dans le cas de la tomodensitométrie (CT), le couple détecteur / source effectue une rotation autour du patient. Ainsi, les données acquises permettent une reconstruction en 3 dimensions, ce qui permet non seulement de détecter, mais également de localiser précisément en profondeur la tumeur (Figure I.6-B).

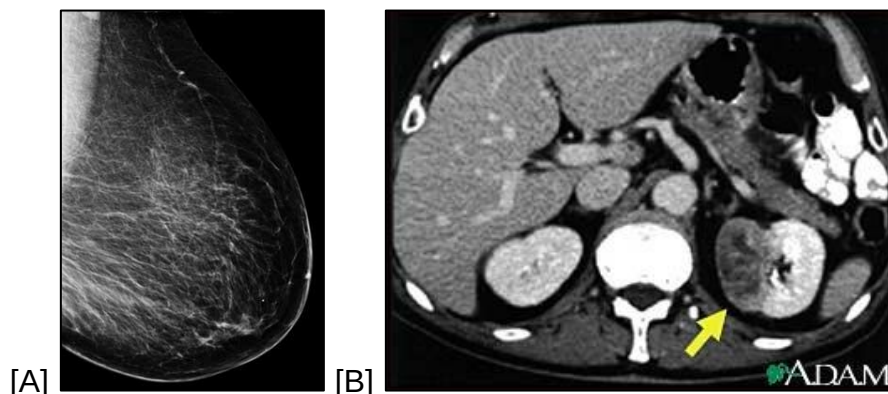


Figure I.6 : Exemples d'imagerie par rayon X.

A- Mammographie d'un sein normal [<http://www.radiologyinfo.org/>]. B- La tomodensitométrie de l'abdomen chez ce patient montre une tumeur sur le rein gauche (flèche jaune) [<http://www.umm.edu/imagepages/1168.htm>]

- *Les ultrasons*

L'imagerie par ultrasons est une des techniques utilisées couramment pour le diagnostic des tumeurs de la thyroïde, du sein, de la prostate, du foie, du pancréas, des ovaires, de l'utérus et des reins (Figure I.7-A). Cette technique permet la visualisation des lésions et est couramment utilisée pour guider les biopsies [Fass, 2008]. Les ultrasons utilisés ont une fréquence de 1 à 10 MHz ce qui permet de visualiser à l'intérieur des tissus. Parce que les ultrasons sont arrêtés par les os et par l'interface avec l'air (comme les poumons), de nombreuses zones du corps ne sont pas accessibles et la profondeur de visualisation est limitée à 10 cm dans la plupart des organes [Frangioni, 2008]. Pour certains examens, la sonde échographique est placée directement sur la peau mais dans certains cas la sonde peut être introduite dans un orifice naturel afin d'observer l'œsophage, le rectum ou le vagin. Les appareils d'échographie permettent également grâce au module doppler de visualiser le flux sanguin à travers les vaisseaux. Cette imagerie est très utile car le flux sanguin tumoral est généralement différent de celui des tissus sains. De plus le doppler couleur peut permettre aux cliniciens de découvrir la dissémination du cancer dans des vaisseaux sanguins, particulièrement dans le foie et le pancréas (Figure I.7-B). Des agents de contraste, telles les microbulles de gaz sont utilisés en clinique pour la détection ou l'évolution du stade de la maladie.

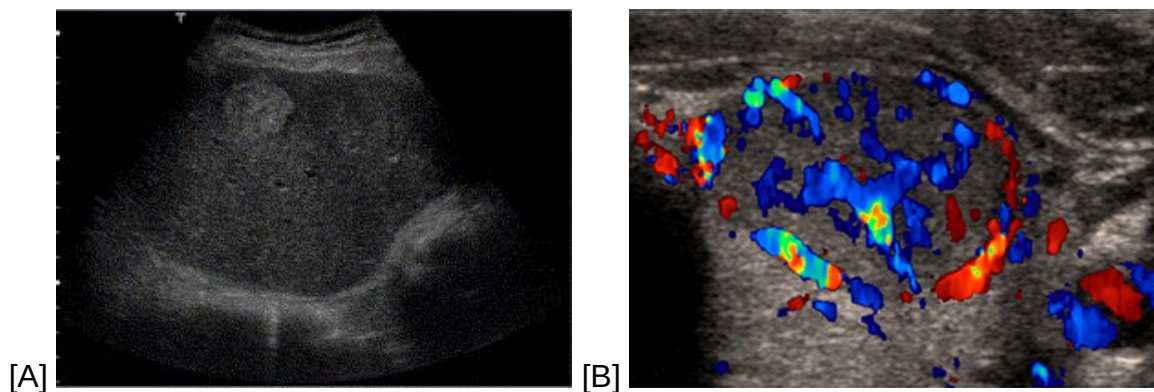


Figure I.7 : Exemples d'utilisation des ultrasons en clinique.

A- imagerie ultrasonore d'une tumeur du foie [Hotta *et al.*, 2005]. B- image d'un nodule de la thyroïde superposée à une image doppler couleur qui démontre sa malignité de par le nombre augmenté de vaisseaux [Frates *et al.*, 2005].

- *L'imagerie par résonance magnétique (IRM)*

L'IRM est une technique de haute résolution qui permet d'obtenir des images en 3D. Elle est souvent plus sensible que le scanner CT pour la visualisation des tissus mous. Une IRM est constituée d'un cylindre contenant un aimant

supraconducteur qui induit un champ magnétique intense. Cette force magnétique induit l'alignement des moments magnétiques (spin) des protons des atomes d'hydrogène dans l'organisme. Des radiofréquences (champs magnétiques plus faibles) sont alors appliquées et induisent un changement de direction des spins. Lors de leur retour à leur position originelle (relaxation), un signal est émis sous la forme d'ondes radiofréquences qui constituent le signal enregistré par l'appareil. Ce signal a deux composantes : la relaxation longitudinale caractérisée par le temps T1, et la relaxation transversale, caractérisée par le temps T2. Le temps de relaxation des molécules d'hydrogène varie en fonction de la composition du tissu et induisent des signaux différents qui sont convertis en images.

Des agents de contrastes peuvent améliorer la qualité de l'image obtenue. Par exemple le gadolinium (Gd^{3+}) accélère la vitesse de relaxation magnétique des protons des molécules d'eau et donc la réponse des tissus aux radiofréquences induisant des images plus claires et contrastées.

L'IRM est un outil qui permet de détecter et de localiser les cancers (Figure I.8-A). Avec cette technique les médecins peuvent dans certains cas discriminer une tumeur cancéreuse d'une tumeur bénigne [ACS, <http://www.cancer.org/>]. De plus l'analyse IRM post-administration d'agent de contraste est la technique de choix pour la détection des tumeurs du cerveau (Figure I.8-B). Elle peut être moins sensible dans des tissus moins homogènes ou plus complexes.

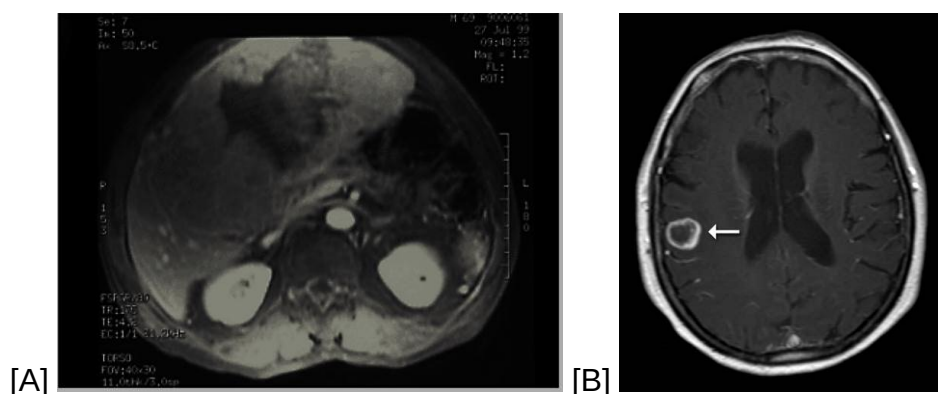


Figure I.8 : Imagerie par résonance magnétique.

A-Imagerie IRM de l'abdomen qui montre la présence d'un carcinome hépatocellulaire [<http://www.snfgc.asso.fr/05-Interne-Chercheurs/0B-internes-etudiants/objectifs/publication4/259.htm/>]
 B-Visualisation d'une métastase au cerveau après injection d'un agent de contraste [<http://www.radiologyinfo.org/>].

- *Tomographie à émission mono-photonique (SPECT, pour single photon emission computed tomography)*

La tomographie à émission mono-photonique est une technique utilisant l'imagerie nucléaire. Une faible quantité de traceur radioactif (émettant des rayons gamma) est injectée par voie intraveineuse et un scanner est utilisé pour réaliser des images détaillées des aires cellulaires ayant capté l'élément radioactif (Figure I.9-A). Le SPECT peut fournir une information sur le flux sanguin des tissus et le métabolisme. Les éléments radioactifs couramment utilisés sont le technétium ^{99m}Tc , l'indium ^{111}I et le gallium ^{67}Ga . Pour optimiser la détection de tumeurs, des anticorps liés à un radiotraceur sont parfois utilisés. Cette technique est extrêmement sensible mais peu résolutive. En revanche, par un couplage à l'imagerie CT, la localisation du signal obtenu par SPECT devient possible, comme par exemple pour la localisation du ganglion sentinelle (Figure I.9-B).

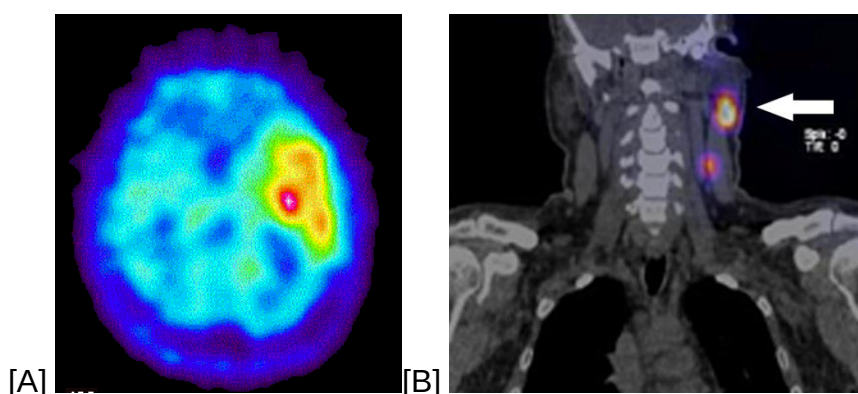


Figure I.9 : Imagerie SPECT.

A- SPECT scan du cerveau : le point rouge met en évidence une tumeur après injection de ^{123}I - α methyltyrosine [http://www.nuclear.kth.se/courses/nucphys/SH2302.htm]. B- la combinaison SPECT/CT permet la localisation du ganglion sentinelle (la flèche correspond au point d'injection de l'agent de contraste) [Bybel *et al.*, 2008]

○ La tomographie par émission de positon (TEP)

La tomographie par émission de positon utilise également des traceurs radioactifs et un scanner pour enregistrer les données et construire des images en 2 ou 3 dimensions. C'est donc une méthode très sensible permettant la détection de changements chimiques comme le métabolisme du glucose au sein d'un tissu. Le mime du glucose le 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F FDG) est l'isotope le plus utilisé pour l'imagerie TEP. Ce traceur permet de localiser les tumeurs car les cellules tumorales sont plus avides de glucose que les autres tissus, permettant ainsi la détection de nombreuses tumeurs sont elles détectables avec cet isotope [Kelloff *et al.*, 2005]. Toutefois, certains tissus sains ont la capacité de retenir ce radiotraceur, ce qui peut induire un mauvais rapport signal sur bruit [Kumar *et al.*, 2006] (Figure I.10-A). De plus, la TEP est mieux adaptée à la détection de tumeurs

très agressives, qu'à la localisation de tumeurs inférieures à 8 mm et/ou moins agressives. Malgré ses points faibles, ce type d'imagerie est très utile pour évaluer et grader les tumeurs. L'imagerie TEP permet aussi de valider l'efficacité du traitement [Frangioni, 2008], en particulier lorsqu'elle est combinée à la tomographie par rayons X (Figure I.10-B).



Figure I.10 : Exemples d'images PET scan.

A- image d'un PET scan chez l'individu sain. Captation normale du radiotraceur 18FDG (noir) dans le cerveau, les reins et la vessie [<http://www.radiologyinfo.org/>]. B-Exemple d'une image PETscan /CT, l'image montre la présence d'une tumeur dans les poumons (spot blanc) [<http://www.radiologyinfo.org/>].

○ *Comparaison de la sensibilité des techniques d'imagerie*

Si l'on compare la résolution des différentes techniques couramment utilisées en clinique nous observons une meilleure résolution pour les techniques d'IRM, d'imagerie ultrasonore et de tomographie (Tableau I.4). Cependant pour ces techniques sont peu sensibles, car la quantité d'agent de contraste nécessaire pour une détection est très importante en comparaison aux méthodes SPECT et TEP. Une des alternatives est l'utilisation combinée de plusieurs techniques afin d'obtenir une quantité d'informations plus importants. Par exemple, comme nous l'avons vu précédemment, la tomographie peut être associée à l'imagerie nucléaire pour la détection et la localisation d'un foyer tumoral.

Modalité	Dimension Voxel/Pixe (µL)	Résolution (mm)	Agent de Contraste	Nombre de molécules d'agent de contraste par Voxel/Pixel requises pour une détection
US	1	1x1x1	Microbulles	NA
CT	1	1x1x1	Iode	3 x 10 ¹⁷
IRM	1	1x1x1	Gd ³⁺ chélaté	3 x 10 ¹³
SPECT	1700	12x12x12	⁹⁹ Tc ¹¹¹ In ⁶⁷ Ga	3 x 10 ⁸
PET	500	8x8x8	¹⁸ F	6 x 10 ⁶

Tableau I.4 : Comparaison de la sensibilité des différentes modalités d'imagerie utilisées en clinique [Frangioni, 2008]. NA : non applicable.

7. Les traitements actuels du cancer

Les traitements du cancer ont pour but de soigner le patient et de prévenir le risque de récurrence. Deux paramètres guident principalement le choix du traitement : les propriétés intrinsèques de la tumeur (type, localisation, stade d'évolution) et les caractéristiques du patient (âge, état de santé, antécédents médicaux et chirurgicaux). Dans cette partie, sont développés les principaux types de traitements actuellement utilisés en clinique.

7.1 La chirurgie

La chirurgie est la plus ancienne forme de traitement du cancer. Elle peut être utilisée pour diagnostiquer, traiter ou encore prévenir le cancer dans certains cas.

○ *Types d'applications de la chirurgie*

En ce qui concerne la chirurgie **préventive**, celle-ci est généralement utilisée pour réséquer des tissus susceptibles d'être ou de devenir cancéreux. Par exemple, ce type de chirurgie est couramment pratiqué dans le cas de polypes précancéreux du côlon. Dans le cadre d'un **diagnostic**, une chirurgie peut-être réalisée afin de déterminer si un prélèvement est cancéreux, le type de cancer et le stade d'évolution. Une chirurgie **curative** peut être pratiquée lorsque la tumeur est délimitée à une seule zone, et que toute la tumeur peut être retirée. Dans ce cas la chirurgie peut être le principal traitement. Enfin, une chirurgie est appelée **cytoréductive** lorsqu'une partie seulement de la tumeur est enlevée en raison de sa trop grande dispersion, ou parce qu'elle causerait trop de dommages aux tissus environnants. Dans ce cas, la chirurgie est associée à une radiothérapie ou à une

chimiothérapie. Ce type de chirurgie est couramment utilisé dans le cancer ovarien et dans certains cas de lymphomes.

- *Les techniques de résection*

Hormis la résection d'un tissu à l'aide d'un scalpel ou d'instruments chirurgicaux, il existe d'autres méthodes physiques pour éliminer les cellules tumorales, trois d'entre elles sont décrites ci-dessous.

La chirurgie laser : un laser de très haute énergie peut être utilisé de manière très focalisée. Il peut remplacer une lame ou un scalpel pour couper autour du tissu. Dans certains cas, le laser peut être utilisé pour brûler et détruire certains tissus, comme dans le cancer du col de l'utérus, du larynx, du foie, du poumon, du rectum ou de la peau.

La cryochirurgie : la source de froid habituellement employée est l'azote liquide, soit par pulvérisation, soit par l'intermédiaire d'une sonde refroidie appliquée sur la lésion pour tuer les cellules tumorales. Cette technique est parfois utilisée dans des conditions pré-cancéreuses (peau, col de l'utérus, pénis) mais l'est aussi dans certains cas de cancer du foie et de la prostate. Les ultrasons et la tomographie peuvent être utilisés pour guider la sonde vers la tumeur et visualiser la congélation des cellules. La limite de cette technique est le dommage infligé aux cellules saines environnantes.

L'électrochirurgie : un courant électrique de haute fréquence peut être utilisé pour détruire les cellules cancéreuses. Cette technique est en général utilisée pour les cancers de la peau et de la bouche.

7.2 La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons de haute énergie afin de tuer les cellules cancéreuses en endommageant leur ADN [Lawrence, 2008]. Ces radiations ne sont pas sélectives et peuvent également tuer des cellules saines environnantes. Cependant le traitement est en général adapté afin de minimiser les effets délétères.

Différents types de radiothérapies peuvent être pratiqués. La méthode la plus couramment utilisée est la radiothérapie **externe** qui consiste à appliquer des rayons à travers la peau et les tissus pour irradier toute la région touchée par la tumeur. La radiothérapie **interne** (curiethérapie) consiste à introduire une source radioactive à proximité de la tumeur. Enfin la radiothérapie **métabolique** est surtout utilisée dans certaines formes de cancers de la thyroïde. Dans ce cas, le composé radioactif est

administré par voie orale ou intraveineuse et va se fixer préférentiellement sur les cellules cancéreuses [<http://www.cancer-chuv.ch>].

Certains patients reçoivent des radiations seules ou en combinaison avec une chimiothérapie. Les trois principales sources de radiations sont les rayons X, les rayons gamma et radioéléments. Le type de thérapie radiative prescrite dépend de plusieurs critères dont les principaux sont : le type de cancer, sa taille, sa localisation, la proximité de la zone tumorale de tissus sensibles, la longueur du trajet que les radiations doivent parcourir et enfin de l'état général du patient. Le Tableau I.5 regroupe des exemples de cancers traités par cette technique.

Cancers précoces curables par radiothérapie	Cancers curables par radiothérapie associée à d'autres modalités thérapeutiques
Cancer de la peau (cellules squameuse et basale)	Carcinome mammaire
Carcinome de la prostate	Carcinome rectal et anal
Carcinome du poumon (non à petite cellules)	Carcinome avancé et localisé du col utérin
Carcinome du col de l'utérus	Carcinome avancé et localisé de la tête et du cou
Lymphomes de Hodgkin et non-Hodgkinien peu avancés	Carcinome du poumon avancé et localisé
Carcinomes de la tête et du cou	Lymphomes avancés
	Carcinome de la vessie
	Carcinomes de l'endomètre
	Tumeurs du système nerveux central
	Sarcomes des tissus mous
	Tumeurs pédiatriques

Tableau I.5 : Exemple de cancers traités par radiation d'après Baskar *et al.*, 2012

7.3 La transplantation

Trois types de transplantations cellulaires peuvent être réalisés : une transplantation de cellules de la moelle osseuse, de cellules souches de sang périphérique et de cellules hématopoïétiques.

La transplantation de cellules de la moelle osseuse ou de cellules souches de sang périphérique est couramment pratiquée dans le traitement des leucémies et des lymphomes. Elle peut également être utilisée pour traiter d'autres cancers tels les neuroblastomes et de nombreux cas de myélomes.

La transplantation de cellules de la moelle osseuse et de cellules hématopoïétiques est également utilisée pour restaurer les cellules souches qui ont été détruites par des fortes doses de chimiothérapie ou de radiations consécutives à un traitement intensif des cellules malignes.

7.4 La chimiothérapie

Il existe deux modes de classification des thérapies médicamenteuses, en fonction du protocole d'administration et en fonction du mode d'action du traitement.

○ *Classification en fonction du protocole d'administration*

Si l'on se place du point de vue du protocole d'administration, il existe trois classes de chimiothérapie :

- la chimiothérapie **néoadjuvante** : ce type de traitement est réalisé avant la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur et faciliter sa résection ;
- la chimiothérapie **adjuvante** : ce type de thérapie est réalisée dans le but d'éliminer toutes les cellules tumorales résiduelles après chirurgie et limiter ainsi la propagation tumorale ;
- la chimiothérapie **métastatique** : cette thérapie est dispensée pour traiter les tumeurs situées dans un foyer secondaire.

Ces chimiothérapies sont généralement administrées par les voies intraveineuse, intramusculaire ou orale.

○ *Classification en fonction du mode d'action*

Du point de vue du mode d'action, on distingue la chimiothérapie conventionnelle ou cytostatique et la chimiothérapie ciblée ou biothérapie.

Dans le cas de la chimiothérapie **conventionnelle**, le mode d'action des agents thérapeutiques est non spécifique. Cette thérapeutique touche essentiellement les mécanismes impliqués dans la division cellulaire qu'elle soit normale ou néoplasique. Elle comprend les agents antimétabolites, les alkylants, les inhibiteurs des topoisomérases, les agents scindants et les poisons du fuseau (Figure I.11).

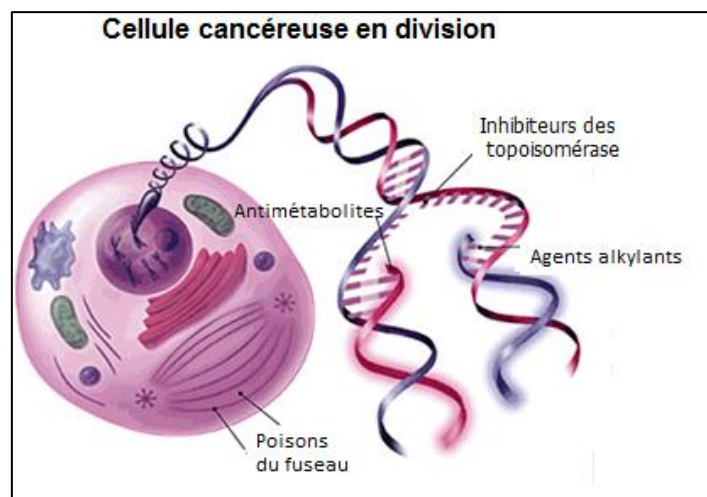


Figure I.11 : Sites d'action des principaux agents antitumoraux cytostatiques [Gerber D, 2008].

En ce qui concerne les **chimiothérapies ciblées**, le mode d'action des médicaments est spécifique et touche les mécanismes de l'oncogenèse des cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple des anticorps monoclonaux, des petites molécules inhibitrices et des agents anti-angiogéniques.

- *Les antimétabolites :*

Il s'agit pour la plupart d'analogues des bases puriques (6-mercaptopurine Purinéthol®, 6-thioguanine Lanvis®) ou pyrimidiques (5-fluorouracile Fluoro-uracile®, capécitabine Xeloda®, tegafur UFT®) des acides nucléiques. Ainsi, ces agents en se substituant aux bases constituant les acides nucléiques, bloquent la transcription et la traduction et arrêtent ainsi la division cellulaire. Il existe également une classe d'agents appelés antifoliques (Méthotrexate® ou Ledertrexate®), analogues de l'acide folique. Ces agents peuvent se lier et inhiber la dihydrofolate réductase, enzyme essentielle pour la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

- *Les agents "intercalants"*

Parmi les agents intercalants, les plus courants sont les antibiotiques de la famille des anthracyclines qui agissent en s'intercalant dans la double hélice de l'ADN et empêchent ainsi la progression des ADN polymérases. Cette intercalation a pour conséquence d'inhiber la réplication et la transcription, mais également de générer des radicaux libres et des liaisons irréversibles aux topoisomérases II. Dans cette classe, nous retrouvons la doxorubicine (Adriblastine®, Caelyx®) et daunorubicine (Cérubidine®, Daunoxome®).

- *Les agents alkylants de l'ADN*

Cette classe de produits ajoute un groupement alkyle à des groupements comme les hydroxyles, carboxyles et amines. Ainsi, leur activité anti-tumorale réside dans leur capacité à former des liaisons covalentes irréversibles avec les nucléotides de l'ADN empêchant ainsi sa réplication. La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bifonctionnels, c'est-à-dire qu'ils possèdent deux groupements alkyles pouvant ainsi former un pont entre deux nucléotides adjacents. Cette classe d'anti-cancéreux regroupe les moutardes azotées (chlorambucil Chloraminophène®, melphalan Alkèran®, cyclophosphamide Endoxan®, ifosfamide Holoxan®), les éthylènes imines, les alkyles sulfonates, les nitrosourées (carmustine Bicnu®, fotémustine Muphoran®, streptozocine Zanosar®) les triazènes (dacarbazine

Déticène®, témozolomide Témodal®) et les dérivés de platines (carboplatine Paraplatine®, cisplatine Cisplatine®, oxaliplatine Eloxatine®).

- *Les inhibiteurs des topoisomérases*

Les topoisomérases sont des enzymes qui ont pour rôle de couper de manière transitoire l'ADN lors de la réplication. Les inhibiteurs de ces enzymes vont donc perturber la réplication de l'ADN lors de la mitose empêchant ainsi la division cellulaire. Des inhibiteurs de la topoisomérase I sont commercialisés l'irinotecan (Campto®) et le topotécan (Hycamtin®). Les inhibiteurs de la topoisomérase II sont l'étoposide (Vépéside®) et le téniposide (Véhem®).

- *Les poisons du fuseau ou agents tubulo-affins*

Ces agents anti-mitotiques bloquent les cellules en phase de mitose en se fixant à la tubuline. Il existe deux classes d'agents : déstabilisants ou inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, et les agents stabilisants ou inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline. Les agents déstabilisants comme les vinca-alcaloïdes (vinblastine Velbé®, vincristine Oncovin®, vindésine Eldisine®, vinorelbine Navelbine®) se fixent sur la sous-unité bêta de la tubuline, empêchant ainsi sa polymérisation avec la sous-unité alpha, ce blocage induit un arrêt du cycle cellulaire en métaphase. Les agents stabilisants ou taxanes (paclitaxel Taxol®, docétaxel, Taxotère®) se fixent également sur la sous-unité bêta mais leur action est différente car ils empêchent *in fine* la dépolymérisation de la tubuline. L'effet produit est le même puisqu'ils induisent le blocage de la cellule en métaphase.

- *Agents scindants de l'ADN*

Les agents scindants forment dans un premier temps un complexe avec le fer et dans un deuxième temps un complexe avec l'ADN. Ces complexes participent à l'apparition de cassures mono ou bicaténares de l'ADN et sont généralement accompagnés d'une génération de radicaux libres (par ex. Bléomycine®).

7.5 Les chimiothérapies ciblées

Les thérapies ciblées peuvent exploiter différentes stratégies comme l'inhibition des enzymes ou des récepteurs aux facteurs de croissance indispensables à la prolifération des cellules cancéreuses. Les approches cliniques les plus efficaces ont

été obtenues avec des anticorps monoclonaux et des petites molécules inhibitrices [Ma et Adjei, 2009 ; Ross *et al.*, 2004 ; Dancey, 2003 ; Dancey et Sausville, 2003].

○ *Petites molécules inhibitrices*

Les petites molécules inhibitrices ont pour mécanisme d'action d'interrompre les processus cellulaires en interférant avec la cascade de signalisation des tyrosines kinases. Les tyrosines kinases interviennent en effet dans de nombreux processus cellulaires en initiant les cascades moléculaires intervenant dans la croissance cellulaire, la prolifération, la migration cellulaire et l'angiogenèse des tissus sains et malins. Ces processus étant amplifiés au sein des cellules cancéreuses, l'utilisation de ces inhibiteurs va préférentiellement agir sur ceux-ci. Le Tableau I.6 présente des exemples de petites molécules inhibitrices et leurs applications cliniques.

Médicaments	Cibles	Indications approuvées par la FDA
Bortezomib (Velcade)	26S protéasome	Myélome multiple, lymphome à cellules du manteau (sous type de lymphome non-Hodgkinien)
Dasatinib (Sprycel)	BCR-ABL, SRC family, c-KIT, PDGFR	Leucémie myéloïde chronique, leucémie lymphocytaire aigüe
Erlotinib (Tarceva)	EGFR	Cancer du poumon non à petites cellules, cancer du pancréas
Gefitinib (Iressa)	EGFR	Cancer du poumon non à petites cellules
Imatinib (Gleevec)	BCR-ABL, c-KIT(CD117), PDGFRA-B, Flt-3, m-CSF récepteur	Leucémie lymphocytaire aigue, leucémie myéloïde chronique, tumeur stromale gastro-intestinale syndrome hyperéosinophilique, mastocytose systémique
Lapatinib (Tykerb)	HER2/neu, EGFR	Cancer du sein avec overexpression de HER2/neu
Sorafenib (Nexavar)	B-RAF, C-RAF VEGFR2-3, FGFR1, PDGFR, c-KIT, Flt-3, RET, EGFR	Cancer des cellules rénales, carcinome hépatocellulaire
Sunitinib (Sutent)	VEGFR1-3, PDGFR, c-KIT, Flt-3, RET	Cancer des cellules rénales, tumeur stromale gastro-intestinale
Temsirolimus	mTOR	Cancer des cellules rénales

Toutes les petites molécules inhibitrices sont administrées oralement sauf le bortezomib qui est administré en i.v. FDA : *U.S. Food and Drug Administration*; BCR-ABL : *breakpoint cluster region-Abelson*; PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor*; EGFR : *epidermal growth factor receptor*; VEGFR : *vascular endothelial growth factor receptor*. FGFR: *FGF receptor*; Flt: *FMS-like tyrosine kinase*; m-CSF: *Macrophage colony stimulating factor*; PDGFR: *PDGF receptor*; VEGFR: *VEGF receptor*.

Tableau I.6 : Petites molécules inhibitrices pour le traitement du cancer [Gerber, 2008, Ott et Adams, 2011].

○ *Les anticorps monoclonaux*

En 1986, la FDA (*Food and Drugs Administration*) a autorisé le premier anticorps monoclonal, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), qui prévient le rejet après transplantation en bloquant l'activité des lymphocytes T cytotoxiques. Depuis,

une vingtaine d'anticorps monoclonaux a reçu l'autorisation de mise sur le marché dont environ la moitié dans le cadre du traitement contre le cancer [Gerber, 2008]. Le Tableau I.7 présente les anticorps monoclonaux utilisés dans le cadre du cancer. Ceux-ci peuvent cibler différents types d'antigènes comme des molécules responsables de la différenciation hématopoïétique, des glycoprotéines surexprimées par les tumeurs solides, des molécules responsables du signal de la croissance et de la différenciation, des molécules ayant un rôle dans l'angiogenèse et enfin des antigènes exprimés par le stroma et la matrice extracellulaire tumorale [Scott *et al.*, 2012].

Catégorie d'antigène	Antigènes	Exemple de thérapie contre cette cible	Type de tumeur exprimant cet antigène
Antigènes de différenciation Hématopoïétique	CD20	Rituximab	Lymphome Non-Hodgkinien I
	CD20	Ibritumomab tiuxetan et tositumomab	lymphome
	CD30	Brentuximab vedotin	lymphome de Hodgkin
	CD33	Gemtuzumab ozogamicin	Leucémie myéloïde aigue
	CD52	Alemtuzumab	Leucémie lymphocytaire chronique
Glycoprotéines exprimées par les tumeurs solides	EpCAM	IGN101 et adecatumumab	Tumeurs épithéliales (sein, côlon et poumon)
	CEA	Labetuzumab	Tumeurs du sein, côlon et poumon
	gpA33	huA33	Carcinome colorectal
	Mucines	Pemtumomab and oregovomab	Tumeurs du sein, côlon, poumon et ovaire
	TAG-72	CC49 (minretumomab)	Tumeurs du sein, côlon et poumon
	CAIX	cG250	Carcinome des cellules rénales
	PSMA	J591	Carcinome de la prostate
	protéines liant le folate	MOv18 and MORAb-003 (farletuzumab)	Tumeur ovarienne
Glycolipides	Gangliosides (GD2, GD3, GM2)	3F8, ch14.18 and KW-2871	Tumeurs Neuroectodermiques et quelques tumeurs épithéliales
Glucides	Le ^y	hu3S193 and IgN311	Tumeurs du sein, côlon, poumon et prostate
Molécules ayant un rôle dans l'angiogenèse	VEGF	Bevacizumab	Vascularisation tumorale
	VEGFR	IM-2C6 et CDP791	Tumeurs solides dérivées de l'épithélium
	Intégrine $\alpha v \beta 3$	Etaracizumab	Vascularisation tumorale
	Intégrine $\alpha 5 \beta 1$	Volociximab	Vascularisation tumorale
Croissance et différenciation du signal	EGFR	Cetuximab, panitumumab, nimotuzumab et 806	Gliome, tumeurs du sein, du poumon, du côlon et de la tête et du cou
	ERBB2	Trastuzumab et pertuzumab	Tumeurs du sein, côlon, poumon, ovaire et prostate
	ERBB3	MM-121	Tumeurs du sein, côlon, poumon, ovaire et prostate
	MET	AMG 102, METMAB et SCH 900105	Tumeurs du sein, poumon et ovaire
	IGF1R	AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507 et CP 751871	Gliome, tumeurs du sein, du poumon, de la tête et du cou, prostate et thyroïde
	EPHA3	KB004 et IIIA4	Tumeurs du poumon, côlon et reins mélanome, gliome et cancers hématologiques
	TRAILR1	Mapatumumab (HGS-ETR1)	Tumeur du côlon, poumon et pancréas ; cancers hématologiques
	TRAILR2	HGS-ETR2 et CS-1008	Tumeur du côlon, poumon et pancréas ; cancers hématologiques
	RANKL	Denosumab	Cancer de la prostate et métastases des os
Antigènes de la matrice extracellulaire et du stroma	FAP	Sibrotuzumab et F19	tumeurs du sein, poumon, côlon, pancréas et de la tête et du cou
	Tenascin	81C6	Gliome, tumeurs du sein et de la prostate

Tableau I.7 : Anticorps monoclonaux pour le traitement du cancer d'après [Scott *et al.*, 2012].

Nous avons vu parmi ces thérapies ciblées, qu'une des cibles des petites molécules inhibitrices ou des anticorps monoclonaux pouvait être l'angiogenèse tumorale. Ce processus, très important dans la progression tumorale, représente une cible particulièrement intéressante que nous allons aborder dans la section suivante.

II. L'ANGIOGENÈSE

1. Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont d'architectures différentes selon leur localisation. Cela fait de l'endothélium un lieu d'échange unique spécifique aux tissus environnants. D'un point de vue morphologique on distingue trois types d'endothélium vasculaire : l'endothélium continu, fenestré ou discontinu (Figure I.12). L'endothélium **continu** ne possède pas d'ouverture, les cellules endothéliales sont soutenues par une membrane basale. Dans le cas de l'endothélium **fenestré**, les cellules endothéliales sont espacées, formant des petites ouvertures d'environ 80 à 100 nm de diamètre. Ces fenêtres sont recouvertes d'un diaphragme non membranaire très fin qui permet le passage de macromolécules. Au sein de cet endothélium, les cellules endothéliales sont soutenues par une membrane basale continue. L'endothélium **discontinu** possède de larges ouvertures non recouvertes par un diaphragme. De plus, cet endothélium possède une membrane basale discontinue et parfois absente. En fonction du type de tissu ou d'organe, le type d'endothélium vasculaire est différent. Par exemple, la barrière hémato-encéphalique est constituée d'un endothélium continu jouant le rôle de barrière, tandis que le foie est constitué d'un endothélium vasculaire fenestré et discontinu qui facilite l'échange de métabolites.

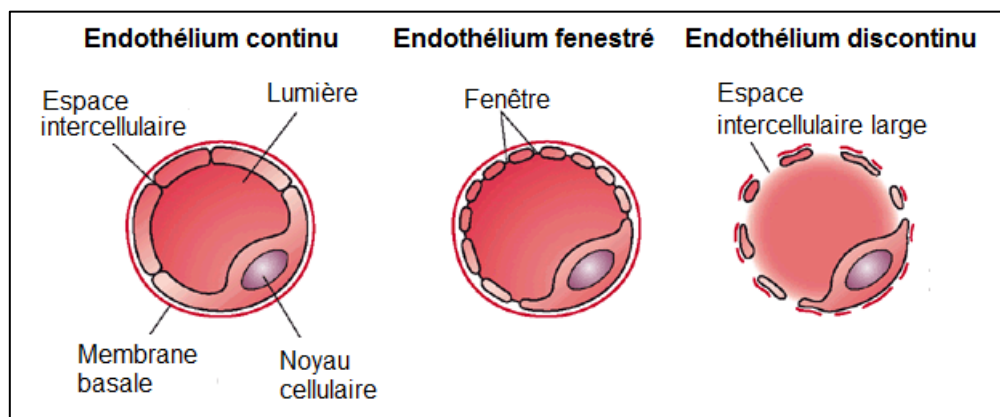


Figure I.12 : Les différents types d'endothélium vasculaire [Cleaver et Melton, 2003].

En plus des différences d'organisation des cellules endothéliales, les vaisseaux présentent des différences de composition. En effet, les gros vaisseaux sont plus complexes, car ils sont composés de différentes couches : une couche de cellules endothéliales, un tissu élastique interne et externe qui entoure le muscle lisse et enfin un tissu conjonctif fibreux. De plus, les veines possèdent des valves de reflux et les artères possèdent une membrane élastique plus épaisse afin de mieux résister à

la pression. Les petits vaisseaux ne sont eux composés que de cellules endothéliales et de péricytes et présentent par endroit une couche de muscles lisses (Figure I.13).

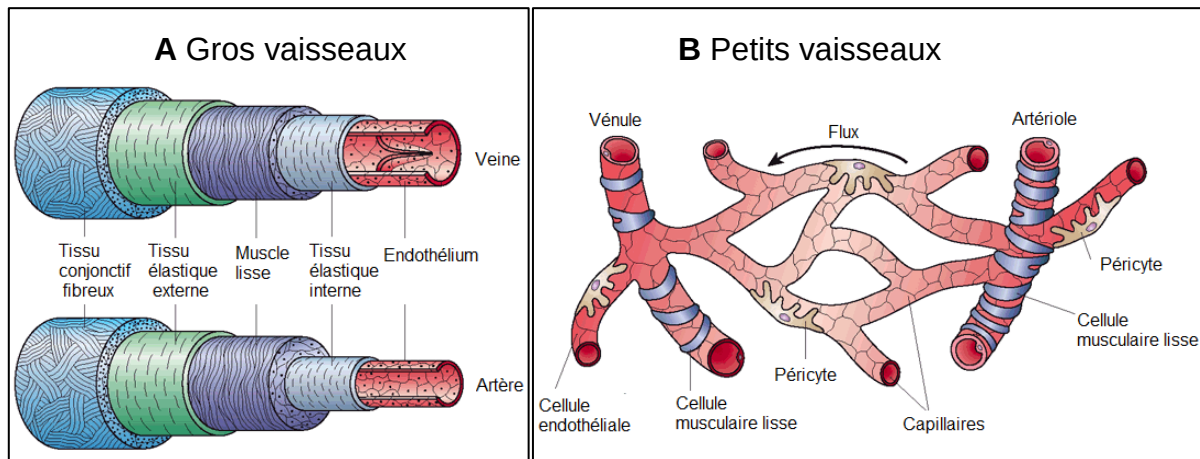


Figure I.13 : Structure des vaisseaux sanguins.
A-gros vaisseaux. B-petits vaisseaux d'après [Cleaver et Melton, 2003].

2. Les différentes voies de formation des vaisseaux

La formation de nouveaux vaisseaux est un processus clé lors de l'expansion des tissus. Elle peut se produire lors du développement embryonnaire et pendant le cycle de reproduction chez la femme, on parle alors d'**angiogenèse de novo**. Pendant un processus physiologique, comme la cicatrisation, ou lors de la réparation de tissus endommagés on parle d'**angiogenèse régénérative**. Enfin, dans le cas de troubles pathologiques comme l'inflammation et les cancers on parle alors d'**angiogenèse pathologique** [Kanwar et al., 2011].

La Figure I.14 illustre la formation des vaisseaux lors d'un processus physiologique. La formation des nouveaux vaisseaux a pour origine la différenciation de cellules mésodermiques en angioblastes puis en cellules endothéliales sous l'action de différents facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), le VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Les cellules endothéliales se multiplient et s'organisent afin de former un réseau de vaisseaux primaires peu fonctionnels, c'est l'étape de vasculogénèse. Enfin, la transformation de ce réseau en vaisseaux sanguins matures est appelée angiogenèse.

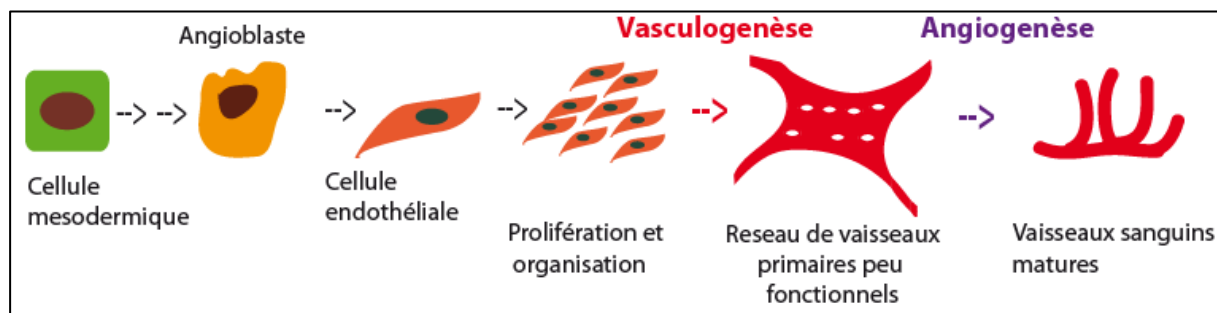


Figure I.14 : La formation des vaisseaux sanguins [Kanwar *et al.*, 2011].

3. L'angiogenèse tumorale

3.1 Le « switch » angiogénique

L'angiogenèse est le développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Elle est déclenchée chez l'adulte lors d'un déséquilibre entre les facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques. Ce phénomène a été défini comme le « switch angiogénique » par Hanahan et Folkman en 1996. En général, le switch est qualifié de « off » lorsqu'il y a une production plus importante de facteurs inhibiteurs (anti-angiogéniques) que de facteurs activateurs de l'angiogenèse (pro-angiogéniques) [Hanahan et Folkman, 1996 ; Pandya *et al.*, 2006]. Quelques exemples des principaux facteurs pro et anti-angiogéniques sont indiqués dans la Figure I.15.

Beaucoup d'activateurs de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales sont des ligands des récepteurs tyrosine kinase [Carmeliet, 2000] comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factors*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*). Cependant, ils peuvent être également d'origines très différentes comme le LPA (*lysophosphatic acid*) [Hu *et al.*, 2001]. Le premier inhibiteur angiogénique décrit est la thrombospondine-1, qui module la prolifération et la mobilité des cellules endothéliales [Volpert *et al.*, 1995]. Il existe également d'autres molécules inhibitrices notamment les statines qui sont dans de nombreux cas des fragments d'une protéine. Par exemple l'angiostatine est un fragment du plasminogène [O'Reilly, 1997].

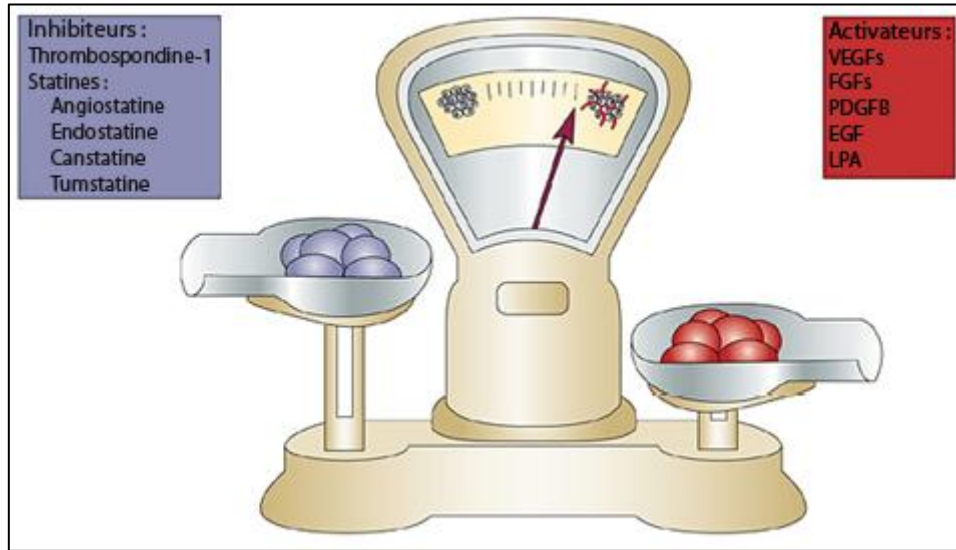


Figure I.15 : « Switch » angiogénique [Bergers et Benjamin, 2003].

En général, le taux d'activateurs et d'inhibiteurs détermine si la cellule endothéliale est quiescente ou en état d'angiogenèse active. Une surexpression continue des facteurs pro-angiogéniques est souvent la cause de situations pathologiques telles que le cancer, l'athérosclérose et la rétinopathie [Folkman, 1995].

3.2 La formation des vaisseaux tumoraux

L'angiogenèse peut se produire principalement par bourgeonnement (*sprouting*) ou intussusception (*splitting*) que nous détaillerons ci-après (Figure I.16) [Hendrix et al., 2003; Carmeliet et Jain, 2000].

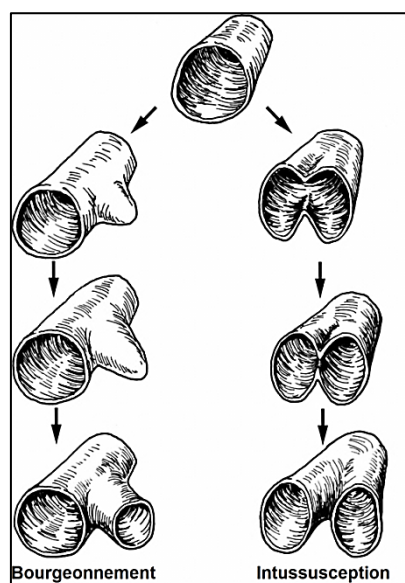


Figure I.16: Angiogenèse par bourgeonnement ou intussusception [Prior et al., 2004].

- *Angiogenèse par bourgeonnement*

Le bourgeonnement se déroule en 5 étapes (Figure I.17). Dans un premier temps, la tumeur va produire des facteurs de croissance qui vont activer les cellules endothéliales (ECs). Celles-ci vont alors produire des protéases qui vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que la membrane basale. Les ECs pourront alors migrer grâce aux intégrines et proliférer, formant ainsi le germe d'un capillaire. Enfin, une étape de remodelage tissulaire par différenciation et polarisation permet aux ECs de s'organiser en structure tubulaire avec une nouvelle lame basale.

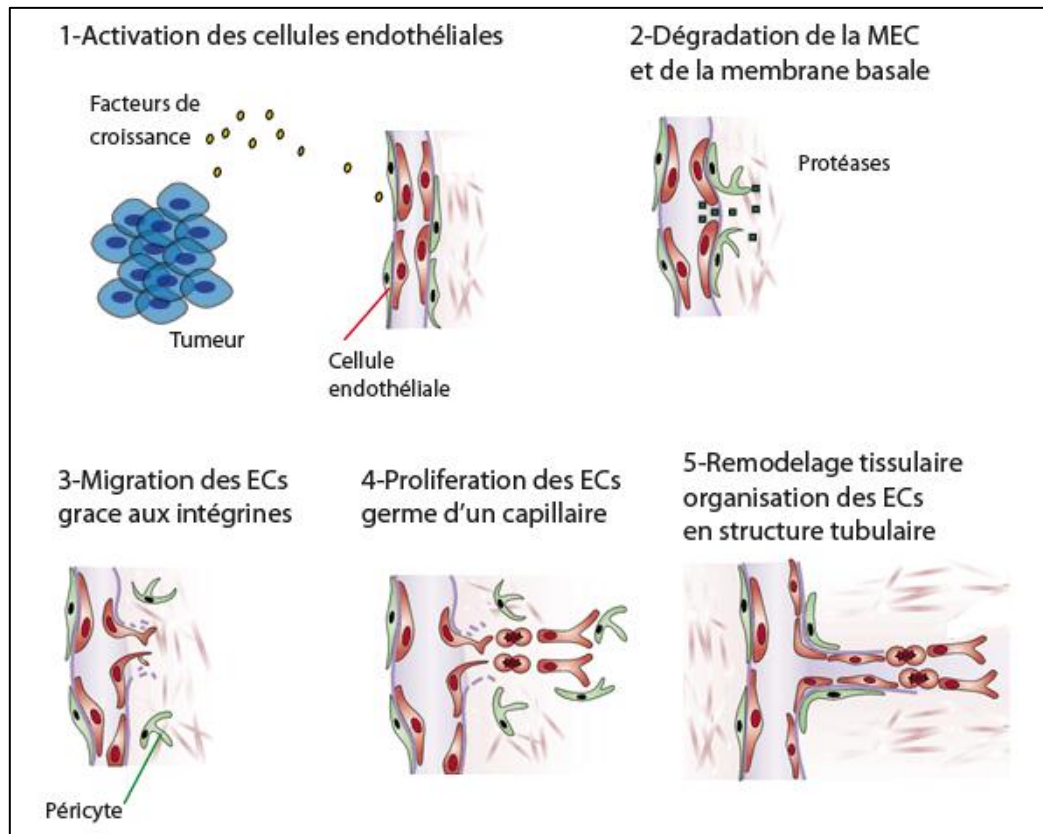


Figure I.17 : L'angiogenèse par bourgeonnement ou sprouting [Berger et Benjamin, 2003].

- *Angiogenèse par intussusception*

Lors de l'intussusception, il est possible d'obtenir 2 vaisseaux à partir d'un seul. Ceci est réalisable en 4 étapes. En premier lieu, deux capillaires opposés établissent une zone de contact. Puis, les jonctions des cellules endothéliales se réorganisent et la membrane du vaisseau est perforée afin de laisser passer facteurs de croissance et cellules dans la lumière du vaisseau. La troisième étape consiste en la formation d'un pilier central (de 1 - 2,5 μm) au niveau de la zone de contact des vaisseaux par invasion des cellules de support telles les myofibroblastes et les péricytes. Enfin, ces cellules produisent des fibres de collagène afin de fournir une matrice extracellulaire et permettre l'élargissement de la circonférence des piliers sans altération qualitative

additionnelle. Ce phénomène est important car c'est la réorganisation d'un réseau de cellules préexistant qui permet une importante augmentation du nombre de capillaires [Kurz *et al.*, 2003 ; Auguste *et al.*, 2005].

Il existe d'autres mécanismes de formation des vaisseaux, tels le recrutement de précurseurs endothéliaux, mais leur implication dans l'angiogenèse tumorale est mal connue.

3.3 Structure et fonction des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux possèdent une architecture différente de celle observée dans les tissus sains (Figure I.18). En effet, la vascularisation tumorale est hautement désorganisée. Les vaisseaux sont tortueux et dilatés avec un diamètre irrégulier et des branchements et dérivations (shunt) veineuses excessives. Ces différences observées sont probablement dues aux déséquilibres des régulateurs angiogéniques comme le VEGF et l'angiopoïétine. Les vaisseaux tumoraux possèdent dans leur paroi de nombreuses ouvertures, des jonctions interendothéliales élargies et une membrane basale absente ou discontinue [Carmeliet et Jain, 2000]. De plus, la formation de nouveaux vaisseaux est rapide et induit une densité vasculaire importante contenant des vaisseaux indifférenciés (sans péricytes), différenciés immatures (sans péricytes) et différenciés matures (avec péricytes) [Qin *et al.*, 2012].

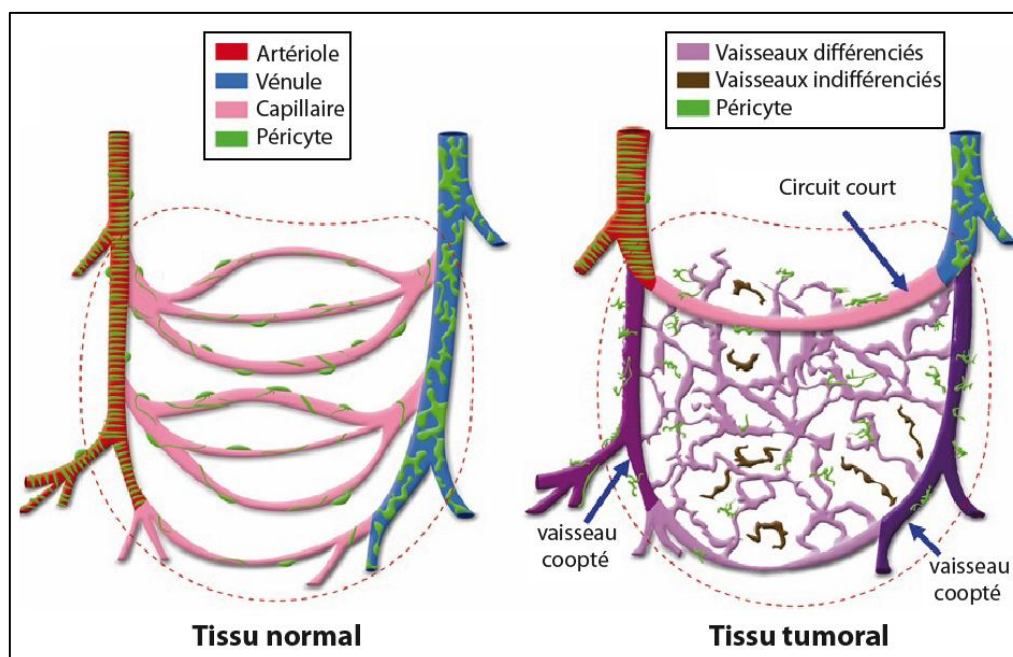


Figure I.18 : Différences entre l'endothélium sain et l'endothélium tumoral [Qin *et al.*, 2012].

Ces anomalies vasculaires ont pour conséquence un flux sanguin variable, une organisation chaotique du réseau vasculaire [Baish et Jain, 2000] et la présence de régions hypoxiques et acides au sein des tumeurs [Helmlinger *et al.*, 1997].

4. Contexte vasculaire particulier aux tumeurs

4.1 Modification du micro-environnement tumoral

Les tissus sains sont irrigués par des vaisseaux sanguins linéaires qui doivent leur intégrité à la présence de péricytes assurant le maintien des cellules endothéliales. La matrice extracellulaire est constituée d'un réseau lâche de fibres de collagène, de fibroblastes et de macrophages. Des vaisseaux lymphatiques sont présents à proximité de ces structures (Figure I.19-A).

Comme nous l'avons déjà évoqué, les vaisseaux sanguins tumoraux ne sont recouverts que d'un très petit nombre de péricytes, ce qui les rend instables. De plus, de nombreuses tumeurs présentent peu de vaisseaux lymphatiques, ce qui a pour conséquence d'induire une mauvaise évacuation des protéines solubles et du fluide interstitiel. La matrice extracellulaire des tumeurs est également différente de celle des tissus sains, celle-ci possédant un réseau plus dense et plus rigide de fibres de collagène. Les tumeurs contiennent également une augmentation du nombre de fibroblastes (Figure I.19-B).

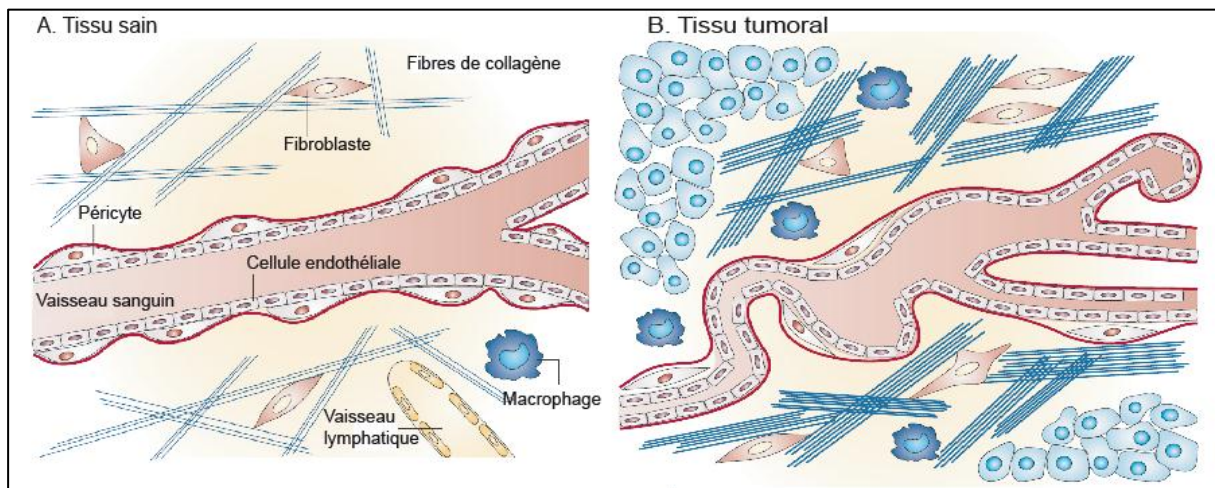


Figure I.19 : Différence entre le réseau vasculaire d'un tissu sain (a) et celui d'une tumeur (b) [Heldin *et al.*, 2004].

4.2 La pression des fluides interstitiels (*interstitial fluid pressure*, IFP)

Young a été le premier à démontrer expérimentalement une augmentation de la pression hydrostatique au sein des tumeurs [Young *et al.*, 1950]. Pour expliquer cette

anomalie, Jain en 1987 a émis l'hypothèse que la pression osmotique dans les tumeurs était plus élevée à cause d'une forte pression interstitielle des fluides au sein de la tumeur. Cette forte pression constitue une barrière pour la délivrance des médicaments [Jain, 1987]. Les différences décrites précédemment entre le tissu sain et le tissu tumoral expliquent cette augmentation de pression. En effet, les fibroblastes présents en plus grande quantité dans le tissu tumoral se lient aux fibres de collagène par l'intermédiaire des intégrines. Ceci a pour conséquence d'exercer une tension entre les fibres. De plus, au sein du tissu tumoral, le nombre de cellules inflammatoires et de macrophages augmente. Ces cellules secrètent des cytokines et des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules endothéliales et le stroma fibroblastique en augmentant la pression interstitielle. L'absence de vaisseaux lymphatiques pour évacuer les fluides interstitiels et les protéines joue également un rôle dans l'augmentation de la pression interstitielle [Heldin *et al.*, 2004].

4.3 Hypoxie et pH au sein des tumeurs

La prolifération des cellules tumorales est tellement rapide que le besoin en oxygène au sein de la tumeur est souvent insuffisant, créant ainsi des zones hypoxiques. Pour pallier ce besoin en oxygène, les cellules tumorales utilisent la glycolyse comme source d'énergie [Warburg, 1956]. Ce phénomène induit au sein des tumeurs une diminution du pH extracellulaire [Pelicano *et al.*, 2006] qui est alors compris entre pH 6.0 et 7.0, ce qui représente une baisse de 0,4 à 1,4 par rapport aux tissus sains [van Sluis *et al.*, 1999 ; Cardone *et al.*, 2005]. La diminution du pH et l'hypoxie au sein du tissu tumoral sont des facteurs impliqués dans la croissance et la diffusion métastatique [Fang *et al.*, 2008].

5. Les cellules endothéliales une cible de choix

Nous avons vu que la vascularisation tumorale joue un rôle crucial dans la progression tumorale de par son rôle de pourvoyeur de nutriments et d'oxygène qui permet le développement tumoral et la dissémination des tumeurs dans d'autres sites. La Figure I.20 schématise ces différentes étapes d'évolution tumorale de la croissance tumorale.

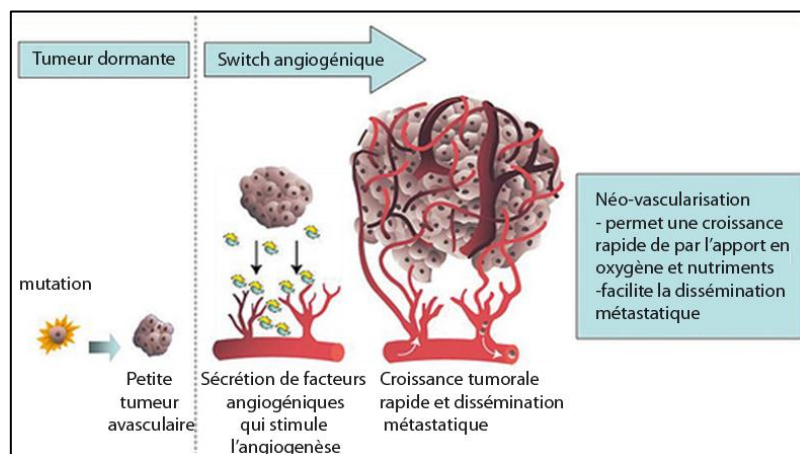


Figure I.20 : Rôle prépondérant de l'angiogénèse dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique. [<http://www.medscape.org/viewarticle/551140> ; Carmeliet et Jain, 2000 ; Bergers et Benjamin, 2003].

Il existe deux stratégies thérapeutiques dirigées contre la vascularisation tumorale: une approche anti-vasculaire et une approche anti-angiogénique (Figure I.21). L'approche anti-vasculaire consiste en la destruction des vaisseaux déjà formés, l'approche anti-angiogénique a pour but d'inhiber la croissance des nouveaux vaisseaux.

Ces deux stratégies thérapeutiques offrent de nombreux avantages en comparaison des thérapies cytotoxiques conventionnelles dirigées contre les cellules tumorales. En effet, ces thérapies ne sont pas restreintes à un tissu tumoral en particulier car la croissance de toutes les tumeurs solides dépend de l'angiogénèse et de leur réseau vasculaire. De plus, la vascularisation tumorale étant accessible par voie systémique, certains anti-angiogéniques n'ont pas la nécessité de franchir les barrières endothéliales [Eichhorn *et al.*, 2004]. Enfin, Les cellules endothéliales seraient moins soumises aux mutations et seraient donc moins susceptibles de développer une résistance au traitement [Kerbel, 1991].

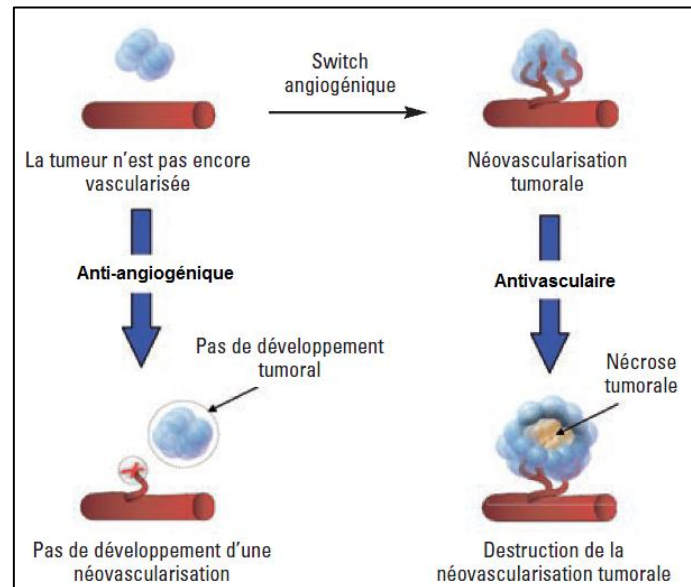


Figure I.21 : L'approche anti-angiogénique et l'approche antivasculaire [Soria, 2012].

Les agents anti-angiogéniques inhibent de manière préférentielle la néo-vascularisation et démontrent une activité plus importante à la périphérie des tumeurs et sur les petites masses tumorales. Ils présentent en général une action cytostatique et favorisent ainsi la stabilisation de la maladie en stoppant la croissance de la tumeur. Les agents antivasculaires induisent des dommages dans la vascularisation déjà établie, une inhibition du flux sanguin tumoral, ainsi qu'une importante nécrose en particulier au cœur de la tumeur [McKeage et Baguley, 2010]. Ils ont donc un effet cytotoxique et induisent une régression rapide de la tumeur. Ces différences d'action sont illustrées Figure I.22.

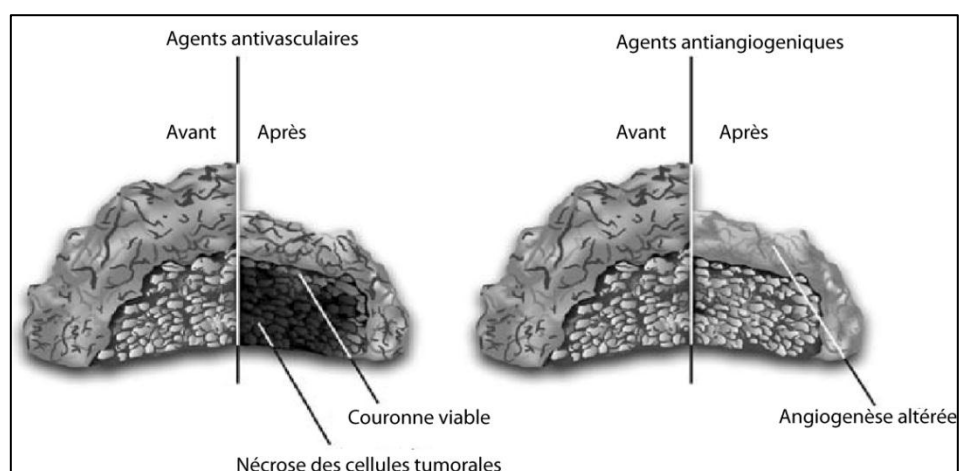


Figure I.22 : Différences entre les agents antivasculaires et les agents anti-angiogéniques [McKeage et Baguley, 2010].

5.1 Les molécules antivasculaires en développement

Parmi les agents antivasculaires, deux composés sont les plus avancés dans leur développement clinique : un flavonoïde le DMXAA (*Dimethyloxoxanthene Acetic Acid*) et des agents tubulo-affins, tels la combrétastatine A4 phosphate (CA4P). Des exemples de composés en cours de développement clinique sont présentés Tableau I.8.

Famille	Nom (code)	Caractéristiques	phase clinique	Applications
Flavonoïdes	Vadimezan ASA404 DMXAA	DMXAA analogue tricyclique de la FAA	III	Cancer du poumon à non petites cellules
	Fosbretabuline tromethamine Zybrestat	Combrétastatine A4 phosphate	II/III	Cancer anaplasique de la thyroïde, cancer du poumon à non petites cellules
Agents tubulo-affins	Ombrabuline AVE8062 AC7700	Analogue de la combrétastatine A4	III	Sarcome
	ABT-751	Sulfonamide antimitotique se lie sur le site colchicine de la tubuline	II	Leucémie aigüe lymphoblastique pédiatrique, neuroblastomes, cancer du poumon à non petites cellules, du sein, du côlon-rectum, des cellules rénales et de la prostate métastatique réfractaire aux hormones
	Soblidotine TZT-1027	Dérivé de la dolastatine-10	II	Sarcome, cancer du poumon à non petites cellules
	Lexibuline CYT997	Petite molécule inhibitrice de la tubuline	II	Myelome multiple, glioblastome
	Dolastatine 10 B720389K560	Pentapeptide	II	Sarcome, cancer des reins, du pancréas, du foie, des conduits biliaires, de la vessie, de la prostate réfractaire aux hormones, lymphome, leucémie lymphocytaire chronique
	Verubuline hydrochloride (Azixa) MPC-6827	Dérivé de la quinazoline	II	Mélanome, glioblastome
	Combrétastatine A1 diphosphate OXi4503	Prodrogue diphosphate de la combrétastatine A1	I	Tumeurs solides, leucémie myélogénique aigue
	Plinabuline NPI-2358	Dérivé de la diketopiperazine	I	Tumeurs solides avancées, lymphomes
	Crolibuline EPC2407	Inhibiteur de la polymérisation de la tubuline	I	Cancers avancés

Tableau I.8 : Agents antivasculaires en développement clinique [McKeage et Baguley, 2010 ; <http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

Le mode d'action de la combrétastatine a été étudié par Tozer et est illustré Figure I.23 [Tozer *et al.*, 2005]. Les molécules de type poison du fuseau induisent une modification de la morphologie des cellules endothéliales. Des réactions en

chaîne vont alors se produire : les cellules ayant perdu leur forme, une augmentation de la perméabilité vasculaire favorisant la fuite des protéines va être observée. Cette fuite de protéines va augmenter la pression du liquide interstitiel provoquant une vasoconstriction. Cette vasoconstriction favorisant la stase des hématies, la viscosité sanguine va alors augmenter provoquant la réduction du flux sanguin.

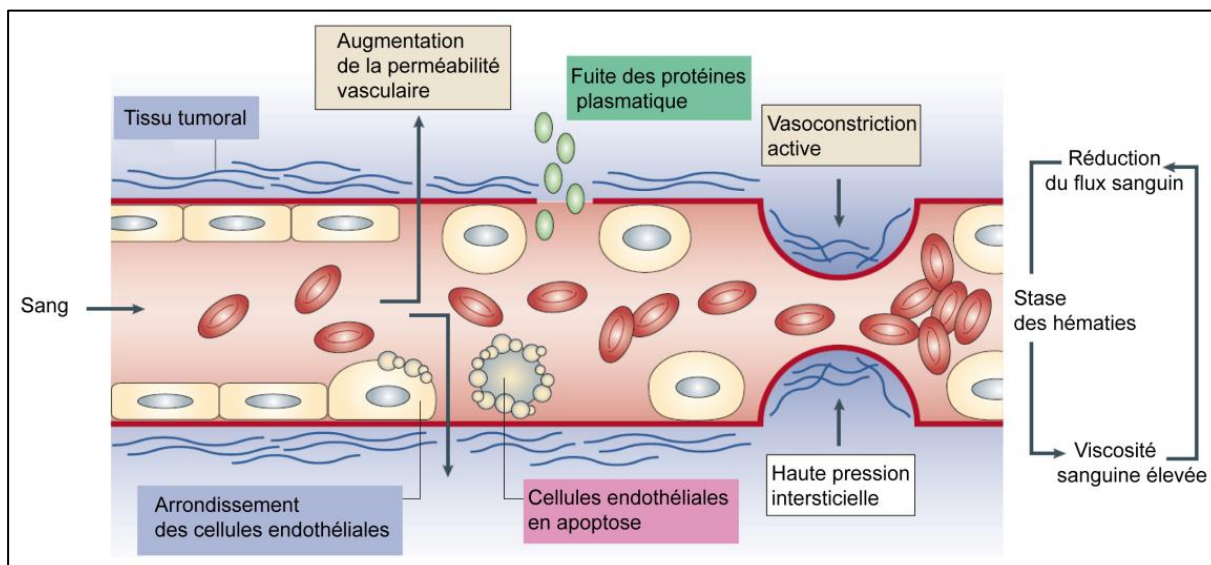


Figure I.23 : Mode d'action de la combrétastatine [Tozer *et al.*, 2005]

Le mode d'action des flavonoïdes et du DMXAA n'est pas encore bien élucidé, une revue de leurs différents effets est présentée dans le chapitre III de ce manuscrit.

5.2 Les molécules anti-angiogéniques en développement

Chez l'adulte, la vascularisation est en général quiescente, avec seulement 0,1 % de cellules endothéliales en division. Ainsi, cibler les cellules endothéliales tumorales permet une approche spécifique dans le cancer [Carmeliet, 2000]. L'angiogenèse requiert la liaison de molécules de signalisation telles que le VEGF à son récepteur présent à la surface des cellules endothéliales. Lorsque le VEGF et d'autres facteurs de croissance endothéliaux se lient à leur récepteur, des signaux de signalisation cellulaire sont initiés et favorisent la croissance et la survie de nouveaux vaisseaux sanguins.

Les inhibiteurs de l'angiogenèse interfèrent à différentes étapes dans ce processus. Par exemple le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement et se lie au VEGF [Shih et Lindley, 2006]. Lorsque le VEGF est lié au bevacizumab, il n'est plus capable de se lier et d'activer son récepteur le VEGFR. D'autres inhibiteurs de l'angiogenèse comme le sorafenib et le sunitinib, se

lient à leur récepteur sur la surface des cellules endothéliales ou à d'autres protéines de la cascade de signalisation cellulaire, et bloquent leur activité [Gotink et Verheul, 2010]. Le Tableau I.9 présente les cibles angiogéniques pour lesquelles des essais cliniques sont actuellement en cours. Certaines de ces molécules comme le bevacizumab, le sunitinib et le sorafenib sont déjà utilisées en clinique et ont déjà été citées dans le paragraphe thérapie ciblée. Les études cliniques en cours sur ces molécules ont pour but d'évaluer d'autres applications ou de valider des associations avec d'autres thérapies anticancéreuses.

Cibles Angiogéniques	Inhibiteur	Type de molécules	Phase	Tumeur ou cellules traitées
VEGF-A	Bevacizumab (Avastin)	Anticorps	II/III	Gliome, cancer du côlon, poumon et du sein
VEGFR tyrosine kinase	Sorafenib (BAY 54-9085, Nexavar)	petite molécule inhibitrice	I/II	Carcinome des cellules rénales, cancer du poumon et du sein
	Tivozanib (AV-951)	petite molécule inhibitrice	I	Carcinome des cellules rénales, cancer du sein métastatique, cancer colorectal avancé
	Cediranib (AZD2171 Recentin)	petite molécule inhibitrice	II	Gioblastome multiforme
	Axitinib (AG-013736, Inlyta)	petite molécule inhibitrice	I/II	Cancer du poumon, du pancréas, gastrique avancé et cancer du sein métastatique
VEGFR et PDGFR tyrosine kinase	Sunitinib (SU11248, Sutent)	petite molécule inhibitrice	II	Carcinome des cellules rénales, cancer du poumon et du sein
Kinases cycline-dépendante	Seliciclib (CYC202, R-roscovitine)	petite molécule inhibitrice	I/II	Cellules endothéliales, cancer du sein, cancer du poumon à non petites cellules, cancer nasopharyngé

Tableau I.9 : Anti-angiogénique en développement préclinique et clinique [Linkous et Yazlovitskaya, 2012; <http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov>]

Mis à part les petites molécules inhibitrices et les anticorps ciblant le VEGF, d'autres molécules présentes sur les cellules endothéliales et nécessaires à l'angiogenèse telles que les intégrines peuvent également être ciblées dans un but thérapeutique. Les essais cliniques sur ces molécules sont présentés ci-après.

6. Les molécules d'adhésion cellulaire ayant un rôle dans l'angiogenèse

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) sont des glycoprotéines transmembranaires qui permettent l'interaction physique entre 2 cellules adjacentes ou entre une cellule et la matrice extracellulaire. Les CAMs sont classées par famille en fonction de leurs propriétés structurelles et fonctionnelles [Francavilla *et al.*,

2009]. Il existe 4 familles de molécules d'adhésion cellulaire : les intégrines, les membres de la famille des immunoglobulines, les cadhérines et les sélectines. Les membres de chaque famille ont été détectés au sein de vaisseaux sanguins néoformés (angiogéniques) [Bischoff, 1997].

6.1 Les intégrines

○ Structure des intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires constituées de deux sous unités, l'une nommée α et l'autre β . Il existe 24 possibilités de paires hétérodimériques puisqu'il existe 18 types de sous unités α et 8 types de sous-unités β chez les mammifères. Les intégrines sont constituées d'un large domaine extracellulaire, qui lie des ligands extracellulaires, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique qui interagit avec des molécules de signalisation cellulaire [Luo *et al.*, 2007] (Figure I.24-A). Le domaine extracellulaire a pour fonction de se lier avec les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène, avec des acteurs de la coagulation comme la thrombospondine et le Facteur de von Willebrand, ou encore avec d'autres molécules d'adhésion cellulaire comme le VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) [Stupack, 2007]. Quelques exemples d'interactions sont présentés Figure I.24-B.

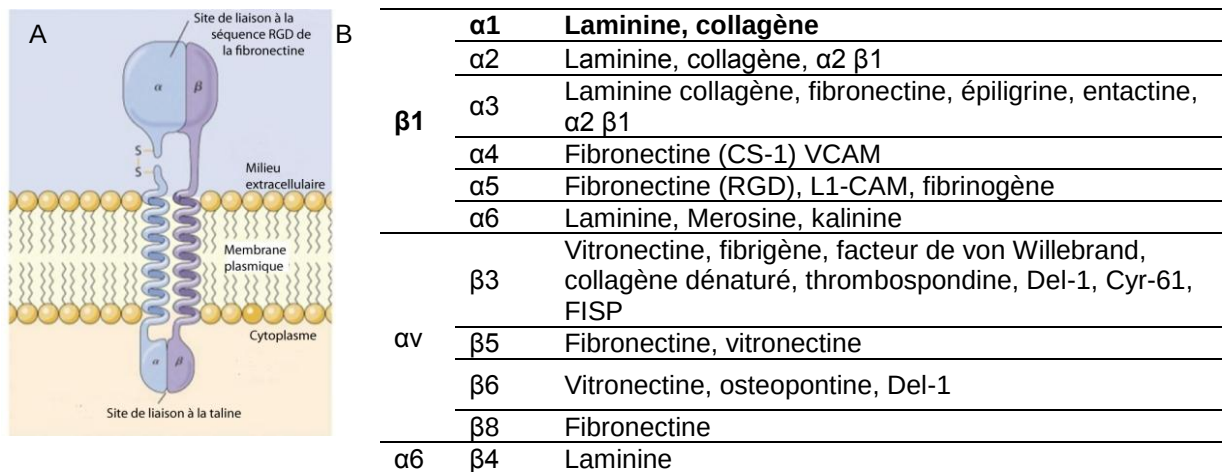


Figure I.24 : Intégrines: structure et ligands endogènes. A-représentation schématique des intégrines [http://www.myvisiontest.com] B-Quelques exemples de liaison des intégrines aux molécules endogènes [Hwang et Varner, 2004].

○ Rôle dans l'angiogenèse

A la surface des cellules endothéliales, les intégrines ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ et $\alpha 5 \beta 1$) participent à la régulation de la migration, de la prolifération et de la survie des

cellules endothéliales pendant la formation de néo-vaisseaux (Figure I.25-1). De plus, l'interaction entre les péricytes et les cellules endothéliales, cruciale pour la stabilisation des nouveaux vaisseaux formés, se fait par l'intermédiaire des intégrines (Figure I.25-2). L'angiogenèse et la progression tumorale sont également assurées par la contribution des cellules myéloïdes et des monocytes qui seraient adressés vers la tumeur par l'intermédiaire de leurs intégrines et produiraient localement des cytokines et des facteurs de croissance (Figure I.25-3). Les fibroblastes, par l'intermédiaire de leur intégrines $\alpha11\beta1$, coopèrent également à ce processus en augmentant la sécrétion de facteurs de croissance (Figure I.25-4) et en formant un dépôt de collagène qui pourrait induire la résistance de certaines tumeurs au traitement (Figure I.25-5). Enfin, l'expression des intégrines $\alpha11\beta3$ par les plaquettes est importante pour leur interaction avec les cellules tumorales via un pont de fibrinogène, favorisant la dissémination métastatique (Figure I.25-6) [Desgrosellier et Cheresh, 2010].

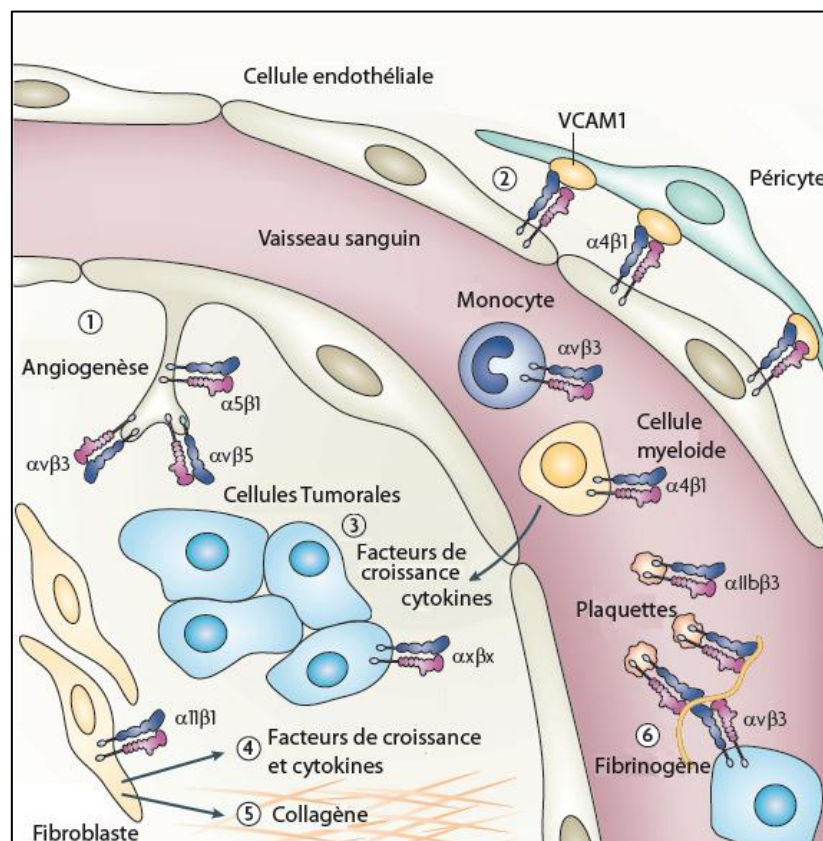


Figure I.25 : Implication des intégrines dans l'angiogenèse et la progression tumorale [Desgrosellier et Cheresh, 2010].

Alors que de nombreuses intégrines sont exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus adultes, les intégrines $\alpha v\beta3$ sont le plus abondamment exprimées par les cellules endothéliales lors du remodelage angiogénique au sein de tissus

pathologiques [Brooks *et al.*, 1995 ; Brooks *et al.*, 1994]. Les intégrines $\alpha\beta_3$, de par leur rôle décrit précédemment, sont une cible idéale pour une stratégie de ciblage thérapeutique, ou à des fins d'imagerie des tumeurs. Pour valider ces stratégies il est nécessaire d'avoir un modèle tumoral adéquat et bien caractérisé.

- *Etudes cliniques*

Les intégrines sont des cibles thérapeutiques hautement intéressantes en oncologie de par leurs rôles décrits précédemment [Desgrosellier et Cheresch, 2010]. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours (Tableau I.10). Le cilengitide, pentapeptide cyclique analogue du RGD, est la molécule la plus avancée dans son développement parmi les inhibiteurs des intégrines dans le domaine du traitement du cancer. Les études précliniques et les études précoces de phases I et II ont démontré une preuve de concept, quoique modeste en terme d'activité antitumorale. Actuellement la phase III vient de terminer sa phase d'enregistrement dans le cas des patients ayant un glioblastome multiforme (GBM) nouvellement diagnostiqué, tandis que des études de phase II dans d'autres indications de tumeurs solides sont en cours [Reardon et Cheresch, 2011 ; Mas-Moruno *et al.*, 2010].

Médicaments	Cible	Type de médicament	Phase clinique	Applications
MEDI-522 (Viatxin, Abegrin, Etaracizumab)	$\alpha\beta3$	Anticorps humanisé	II	Mélanome métastatique, cancer de la prostate métastatique, carcinome colorectal
M200 (volociximab)	$\alpha5\beta1$	Anticorps chimère souris/homme	II	Mélanome métastatique, carcinome des cellules rénales, cancer du poumon no à petites cellules
CNTO 95	$\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$	Anticorps humain	I/II	Cancers avancés réfarctaires
PF-04605412	$\alpha5\beta1$	Anticorps monoclonal	I	Tumeurs solides non répondeuses aux thérapies standards
Natalizumab	$\alpha4\beta1$, $\alpha4\beta7$	Anticorps IgG4 recombinant humanisé	IV	Sclérose multiple
Ro 27-2441	—	Antagoniste des intégrines	II	Asthme
EMD 525797	$\alpha\gamma$	Anticorps chimère souris/homme	I	Tumeurs solides
IMGN388	intégrines	Anticorps monoclonal conjugué	I	Tumeurs solides
BG00002	$\alpha4$	Anticorps recombinant humanisé	II/III	Sclérose multiple
ATN-161	$\alpha5\beta1$	Peptide	I/II	Gliome malin
EMD 121974 (cilengitide)	$\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$	Peptide	II/III	Mélanome métastatique, cancer de la prostate , cancer du pancréas, cancer du poumon non à petites cellules, glioblastome multiforme
JSM6427	$\alpha5\beta1$	Peptide	I	Dégénération maculaire

Tableau I.10 : Essais cliniques sur des molécules ciblant les intégrines [Avraamides *et al.*, 2008 ; <http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>]

Des études cliniques sont également actuellement en cours pour le ciblage des intégrines pour la visualisation des tumeurs (Tableau I.11).

Médicaments	Cible	Type de médicament	Phase clinique	Applications	Type d'imagerie
[18F]AH-111585 (Fucilatide F 18)	$\alpha\beta3$ $\alpha\beta5$	peptide contenant la séquence RGD couplée à la fluorine F 18	II	Gliome avancé, cancer du poumon, cancer de la tête et du cou, sarcome, mélanome	TEP
^{99m}Tc-NC100692	$\alpha\beta3$ $\alpha\beta5$	peptide contenant la séquence RGD couplée au technétium	II	Cardiomyopathie hypertrophique, Syndrome coronaire aigue	SPECT
⁶⁸Ga-BNOTA-PRGD2	$\alpha\beta3$	peptide contenant la séquence RGD couplée au gallium	0	Cancer du poumon	TEP /CT/SPECT

Tableau I.11 : Essai cliniques en cours sur l'utilisation du ciblage des intégrines pour la visualisation de foyers tumoraux [<http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

6.2 Les sélectines

○ *Structure des sélectines*

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires classifiées en fonction de leur site d'expression au sein de l'organisme. Il en existe trois types : les sélectines-E pour endothélium activé, les sélectines-P pour plaquettes et les sélectines-L pour lymphocytes [pour revue Jubeli *et al.*, 2012]. Les sélectines-E sont des protéines de 64 kDa également connues sous le nom de CD62E, ELAM-1 et ELAM-2 (endothelial-leukocyte adhesion molecule) et sont exclusivement exprimées dans un contexte non pathologique par les cellules endothéliales. Elles sont parfois sous forme glycosylée et ont alors un poids moléculaire compris entre 100 et 150 kDa [Pahlsson *et al.*, 1995]. Leur structure primaire possède trois domaines, un domaine terminal aminé de liaison à la lectine, un domaine de liaison à l'EGF (epidermal growth factor) et 6 motifs répétés, d'environ 60 acides aminés, chacun similaire à ceux trouvés dans les protéines de liaison au complément [Bevilacqua *et al.*, 1989]. Le domaine lectine et le domaine EGF sont impliqués dans les interactions des cellules endothéliales avec les leucocytes.

○ *Fonction dans l'angiogenèse*

Les sélectines jouent un rôle important dans la régulation physiologique, mais elles sont également impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation, le cancer et la formation de métastases. En effet, la détection des sélectines-E au sein de la vascularisation tumorale de patients atteints de cancer colorectal a été observée par Kiriyaama en 1995. Cette expression est induite par des stimuli provenant des cellules tumorales. De plus, lors de cette étude, Ye a observé une expression inversement proportionnelle à la distance des vaisseaux [Ye *et al.*, 1995]. La sélectine-E a pour ligand le sialyl lewis X, cette interaction est bien décrite dans la littérature [Somers *et al.*, 2000 ; Pichierri et Matsuo, 2002] et est très importante dans l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium pendant le processus métastatique. En effet, pour certaines lignées tumorales, après le détachement de quelques cellules de la tumeur primaire, l'adhésion à l'endothélium vasculaire n'est possible que par l'interaction du sialyl lewis X exprimé à la surface des cellules tumorales avec leur ligand la sélectine-E exprimée par l'endothélium vasculaire (Figure I.26) [Takada *et al.*, 1993].

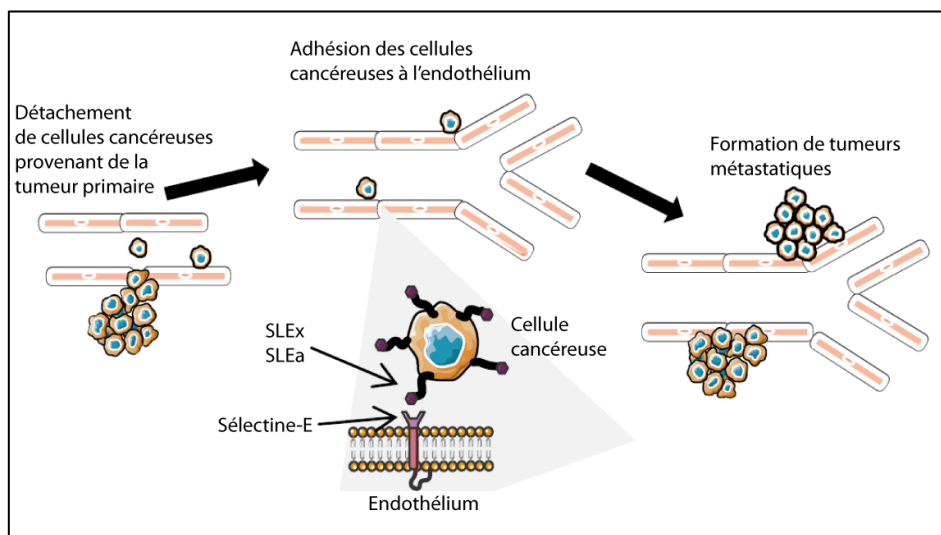


Figure I.26 : Représentation schématique de la diffusion métastatique via la sélectine-E [Jubeli et al., 2012].

○ *Etudes pré-cliniques et cliniques*

De par leur rôle dans la diffusion tumorale, le ciblage des sélectines est une stratégie intéressante dans un contexte thérapeutique. Comme les intégrines $\alpha\beta_3$, les sélectines-E ne sont pas exprimées par l'endothélium des tissus sains mais par les micro-vaisseaux qui contiennent des cellules endothéliales en prolifération [Kraling et al., 1996]. Dans un but thérapeutique, des antagonistes ont été développés pour cibler les sélectines-E, comme des anticorps, des ligands inhibiteurs et des mimes métabolites des glucides [Barthel et al., 2007, Jubeli et al., 2012]. Le Tableau I.12 liste les études précliniques réalisées qui prouvent la validité de cette stratégie *in vitro* et *in vivo*.

Système	Elément de reconnaissance	Méthode de liaison	Evaluation	Références
Liposomes	Anticorps sélectine-E	liaison directe	In vitro (statique et flux)	Bendas et al., 1998
	Anticorps sélectine-E (rat IgG)	liaison covalente directe ou par un espaceur PEG	In vitro (statique)	Bendas et al., 1999
	Anticorps sélectine-E murin anti sélectine-E Anticorps monoclonal BBA 26	liaison covalente par un espaceur PEG	In vitro (statique)	Kessner et al., 2001
	Anticorps monoclonal murin anti sélectine-E IgG2a (H18/7)	liaison covalente avec un lipide formant le liposome	In vitro (statique)	Spragg et al., 1997
	Anticorps monoclonal de souris anti sélectine-E humaine	liaison covalente via une ancre N-dod-PE	In vitro (statique)	Gunawan et Auguste, 2009
	SLEx	Liaison via la sérum albumine	In vivo: arthrite induite au collagène	Minaguchi et al., 2008
Microsphères poly (ε-caprolactone)	Anticorps humanisé anti sélectine-E et sélectine-P (HuEP5C7.g2)	Absorption simple	In vitro (flux)	Dickerson et al., 2001
Microsphère/nanosphères polystyrène	Anticorps humanisé anti selectine-E et sélectine-P (HuEP5C7.g2)	couplé avec la fraction Fc de la protéine A absorbée sur les particules	In vitro (statique)	Blackwell et al., 2001
Microspheres PLA-PEG	Anticorps monoclonal murin 68-5H11 (anti sélectine-E IgG1 humain)	interaction neutravidine-biotine	In vitro (flux) / In vivo (injection intrascrotale de TNF-α)	Sakhalkar et al., 2003
Nanoparticules PLA	mannose SLEx	liaison covalente avec un squelette polymérique	In vitro (statique)	Banquy et al., 2008
Copolymères HPMA	Peptide dérivé de l'acide quinique analogue du SLEx	liaison covalente avec un squelette polymérique	In vitro (statique)	Shamay et al., 2009
Microparticules lipidiques	Ligand peptidique thiolé de la sélectine-E	liaison covalente avec espaceur PEG	In vitro (flux)	Myrset et al., 2011

Tableau I.12 : Systèmes ciblant la sélectine-E, études précliniques [Jubeli et al., 2012, <http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

Des études cliniques en cours (une en phase I et une en phase II), évaluent le ciblage par instillation nasale de la sélectine-E dans le cadre d'accidents cérébrovasculaires ischémiques [<http://www.clinicaltrials.gov>]. Des travaux sur l'homme sont également en cours dans le cadre de l'évaluation de sondes d'imagerie. En effet, des composés radioactifs immunoconjugués avec le fragment F(Ab)² de la sélectine-E sont actuellement évalués dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde et des maladies inflammatoires de l'intestin [Bhatti et al., 1998 ; Jamar et al., 2002].

III. NANOPARTICULES ET CANCER

La chimiothérapie conventionnelle permet une distribution non spécifique du principe actif dans l'organisme qui atteint aussi bien les cellules saines que les cellules cancéreuses. Un moyen de réduire la toxicité systémique des chimiothérapies est de cibler spécifiquement les anomalies de la vascularisation tumorale comme nous l'avons vu précédemment. Il existe une autre approche qui consiste en l'utilisation d'une stratégie de ciblage tumoral par des nanovecteurs.

1. Propriétés/Avantages des nanovecteurs

L'encapsulation d'un principe actif au sein d'un nanovecteur présente certains avantages par rapport aux chimiothérapies conventionnelles. La biodistribution du vecteur étant prédominante sur celle de l'agent encapsulé, la biodistribution du cytotoxique s'en trouve favorisée pour un ciblage tumoral. En effet, les nanovecteurs permettent une délivrance plus spécifique du principe actif au sein des tumeurs, réduisant de ce fait la toxicité éventuelle de ce dernier envers les autres tissus de l'organisme. Enfin, les nanovecteurs permettent un meilleur contrôle de la distribution du principe actif au sein de l'organisme de par leur formulation plus complexe. La Figure I.27 schématise la différence de distribution d'un principe actif lorsqu'il est encapsulé ou non.

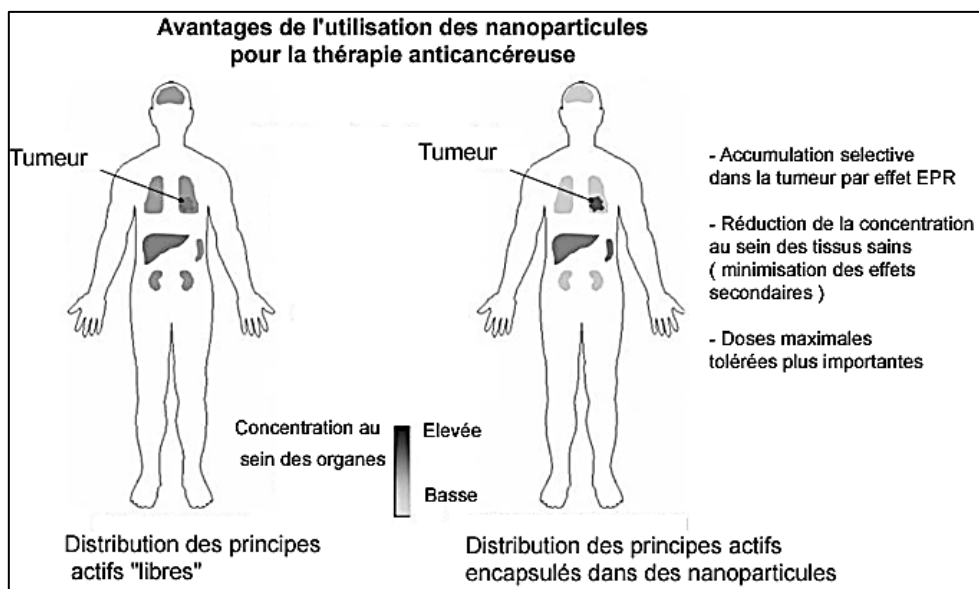


Figure I.27 : Avantages de l'utilisation de formulations pour la thérapie anticancéreuse [Alexis et al., 2010].

2. Mécanisme d'action

2.1 Ciblage passif

Les anomalies structurelles de la vascularisation tumorales jouent un rôle majeur en augmentant la diffusion et la rétention des nanovecteurs au sein des tumeurs. Ceci est communément appelé l'effet EPR pour « *Enhanced Permeability and Retention* ». Matsumura et Maeda ont été les premiers à observer la capacité d'accumulation de macromolécules d'un poids moléculaire compris entre 15 et 70 kDa au sein des tumeurs [Matsumura et Maeda, 1986]. En effet, l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux permet l'extravasation et l'accumulation, au sein des tumeurs, de particules comme les micelles et les liposomes d'une taille comprise entre 10 et 500 nm. Un temps de circulation prolongé dans le sang est la condition requise pour ce type de délivrance de médicament afin d'obtenir une accumulation suffisante du vecteur au sein de la cible [Torchilin, 2000]. Comme nous l'avons vu précédemment, les anomalies de l'endothélium tumoral comme l'activation de l'angiogenèse et la vascularisation importante, l'absence de membrane musculaire et de péricytes, la présence de fenestrations dans l'architecture vasculaire, la direction et le flux sanguin inconstants, l'inefficacité du drainage lymphatique ainsi que le faible retour veineux, sont autant de facteurs qui favorisent l'accumulation des particules et sont responsables de l'effet EPR observé au sein de l'espace interstitiel tumoral [Maeda, 2001 ; Danhier *et al.*, 2010].

Les nanovecteurs qui ont une taille et une charge de surface appropriées permettant de limiter la séquestration par le système réticulo-endothélial (RES) peuvent circuler assez longtemps dans le sang pour aller s'accumuler dans la tumeur par simple effet EPR. Cependant, une quantité importante de vecteur reste malgré tout séquestrée par le foie et la rate. Ces limites ont motivé le développement de stratégies utilisant les interactions ligand récepteur communément appelé ciblage actif [Hu et Zhang, 2009].

2.2 Ciblage actif

Afin de diriger de manière plus spécifique les nanovecteurs il est possible de décorer les nanoparticules de molécules ciblantes tels que des anticorps ou des ligands [Hu et Zhang, 2009]. **Les Anticorps** peuvent être conjugués directement sur le principe actif comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les thérapies ciblées, mais peuvent également être associés à des nanovecteurs. **Les ligands**, généralement peptidiques, peuvent reconnaître différentes cibles, telles le récepteur

au folate, les lectines, le récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER), le facteur de croissance des cellules endothéliales (*VEGF Vascular Endothelial Growth Factor*) ou encore les intégrines. Ceux-ci ont déjà été utilisés pour diriger les nanoparticules spécifiquement vers les tumeurs [Mohanty *et al.*, 2011; Trapani *et al.*, 2012].

La Figure I.28 schématise les différences entre le ciblage passif et le ciblage actif. On peut observer que dans le cas du ciblage actif les nanovecteurs peuvent être retenus au sein des tumeurs et internalisés grâce à la fixation de leur ligand sur leur récepteur, permettant ainsi la libération du principe actif dans le cytoplasme de la cellule tumorale cible.

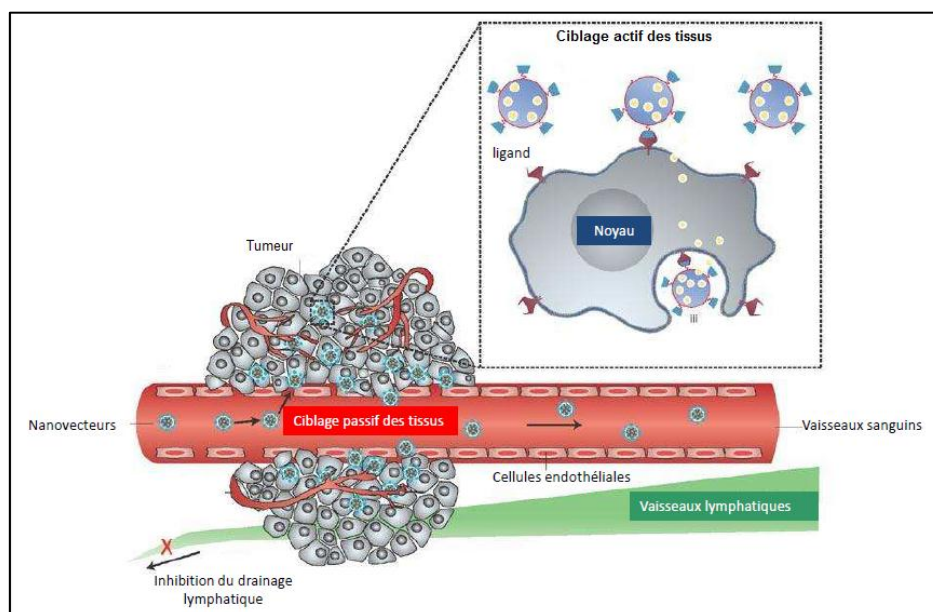


Figure I.28 : Le ciblage passif et le ciblage actif des tumeurs [Peer *et al.*, 2007].

3. Les différents systèmes de vectorisation

Les nanomédicaments peuvent être définis comme des objets inertes d'une taille comprise entre 10 nanomètres et 1 micromètre. Ils sont constitués de 2 composants : le vecteur et le principe actif. Il existe différents types de nanovecteurs qui sont décrits dans de nombreuses revues et dont nous détaillerons les principales caractéristiques ci-après. [Brigger *et al.*, 2002 ; Cho K, 2008 ; Danhier *et al.*, 2010, Cegnar M, 2005].

Les nanosphères et les nanocapsules sont des nano-objets qui incluent respectivement le principe actif dans la matrice polymérique ou bien dans une cavité aqueuse ou huileuse au cœur de la particule [Brigger *et al.*, 2002 ; Couvreur, 2001 ; Hillaireau et Couvreur, 2009].

Des conjugués peuvent être réalisés avec des polymères ou des lipides afin de rendre un principe actif furtif ou de modifier sa pharmacocinétique. Ils sont de petite taille de 3-20 nm et permettent le transport de médicaments grâce à un espaceur. Ils peuvent être également adressés à un site spécifique à l'aide d'un ligand. C'est le cas par exemple de conjugués acide polyglutamique-paclitaxel [Li et Wallace, 2008 ; Li *et al.*, 1999], ou plus récemment de dérivés cytostatiques conjugués à du squalène [Allain *et al.*, 2012 ; Duncan *et al.*, 2006]. Il existe également des conjugués de type protéique qui sont très étudiés. Un conjugué paclitaxel de type albumine est déjà sur le marché sous le nom d'Abraxane.

Les micelles polymériques (ou copolymères amphiphiles) d'une taille d'environ 50 nm possèdent un cœur hydrophobe qui permet l'encapsulation de principe actif peu soluble et une couronne hydrophile. Cette couronne permet de stabiliser le cœur hydrophobe, de rendre le polymère hydrosoluble permettant ainsi une injection systémique, et de prévenir contre les interactions non spécifiques avec les composants du sang [Adams *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2008].

Les dendrimères sont formés par polymérisation successive de monomères. Les réactions sont généralement réalisées de manière radiale à partir du cœur central. Ces macromolécules ont une taille monodisperse, elles sont en général solubles dans l'eau et sont fonctionnalisables en surface [Svenson et Tomalia, 2005, Nanjwade *et al.*, 2009]. A titre d'exemple, le dendrimère polyamidoamine (PAMAM) conjugué au cisplatine est un composé très soluble dans l'eau et permet un relargage lent de ce principe actif chez l'animal. Dans l'étude de Malik en 1999, il a été observé une activité de la formulation dendrimère-cisplatine sur un modèle de tumeur B16F10 alors que le cisplatine seul n'a démontré aucune activité. Le dendrimère a également démontré une accumulation 50 fois plus élevée dans les tissus tumoraux par effet EPR en comparaison au cisplatine seul. Enfin, cette formulation permet également une toxicité réduite d'un facteur 3 à 15 en comparaison au cisplatine libre [Malik *et al.*, 1999].

Les nanotubes de carbone sont des petits cylindres de 10 nm à 1 µm de long et de quelques nanomètres de diamètre exclusivement synthétisés à partir d'atomes de carbone. On distingue les nanotubes de carbones possédant un seul feuillet de carbone d'un diamètre de 0,4 à 2 nm, des nanotubes de carbones constitués de

plusieurs feuillets de carbone et qui peuvent atteindre une taille de 1 à 3 nm pour le tube interne et de 2 à 100 nm pour le tube externe. Dans le cas des nanotubes les principes actifs sont généralement liés sur la surface préalablement fonctionnalisés [Klumpp *et al.*, 2006 ; Bekyarova *et al.*, 2005].

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs couches de phospholipides entourant un compartiment aqueux. Initialement développés pour mimer les membranes biologiques, Gregoriadis G. a été le premier à proposer de véhiculer des principes actifs dans ces systèmes colloïdaux [Gregoriadis *et al.*, 1971 ; Gregoriadis et Ryman, 1971 ; Gregoriadis, 1973]. Grâce à leur structure, ils permettent d'encapsuler des principes actifs hydrophobes ou hydrophiles. Ils peuvent avoir un diamètre compris entre 80 nm et 1 μ m [Malam *et al.*, 2009]. Ce type de particules ayant été utilisé lors de nos études, le procédé de fabrication ainsi que leurs caractéristiques seront développés dans la partie III de ce manuscrit.

Les émulsions sont la dispersion de deux liquides non miscibles entre eux. Elles sont constituées d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse. Une nanoémulsion est donc une émulsion dont les particules sont de taille nanométrique. Il existe différents types d'émulsion, les émulsions aqueuses ou huileuses. Les émulsions « huile dans l'eau » (aqueuses) sont formées par la dispersion de gouttellettes huileuses dans l'eau et les émulsions « eau dans huile » (huileuses) sont formées par la dispersion de gouttellettes d'eau dans l'huile. Les émulsions sont généralement peu stables, c'est pourquoi afin de les stabiliser un émulsifiant est ajouté à la préparation. Par exemple, dans le cas d'une émulsion aqueuse l'émulsifiant forme un film fin au sein de la phase dispersée (eau) et stabilise l'ensemble. Dans ce genre de formulation il est possible d'incorporer un principe actif lipophile dans le cœur.

Les cyclodextrines sont de la famille des oligosaccharides cycliques et possèdent une face externe hydrophile et une cavité centrale lipophile. Elles sont composées de sous-unités glucopyranose liées en α -(1,4). Les cyclodextrines sont couramment utilisées comme « cages moléculaires » en pharmacie, en agrochimie et dans l'industrie alimentaire et cosmétique [Roux *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2002]. Dans l'industrie pharmaceutique elles sont utilisées complexées à des agents et elles permettent d'augmenter la solubilité dans l'eau de principes actifs peu solubles ainsi

que d'augmenter leur biocompatibilité et stabilité [Loftsson et Duchene, 2007]. Des revues décrivent leur implication dans la délivrance de médicaments [Agueros *et al.*, 2011, Dass, 2004 ; Arun *et al.*, 2008; Del Valle, 2004]. Le Tableau I.13 regroupe la structure et les principales caractéristiques des systèmes de vectorisation évoqués précédemment.

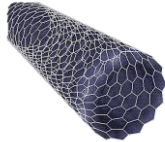
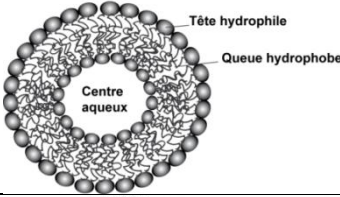
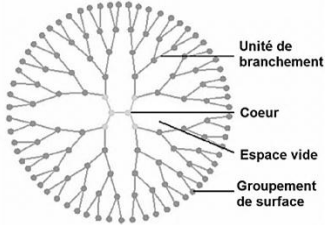
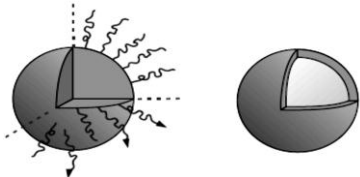
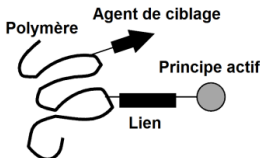
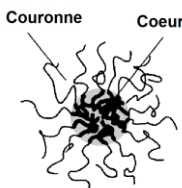
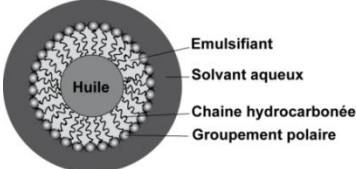
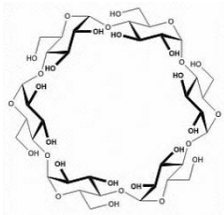
Nom	Structure	Composition/ taille
Nanotubes		Atomes de carbone 10 nm à 1 µm de long et de quelques nanomètres de diamètre
Liposomes	 Tête hydrophile Queue hydrophobe Centre aqueux	Lipides amphipathiques, taille : 80 nm à 1 µm
Dendrimères	 Unité de branchement Coeur Espace vide Groupement de surface	Monomères 10 nm
Nanocapsules et nanosphères		Polymères biodégradables et biocompatibles 50-200nm
Conjugués	 Polymère Agent de ciblage Principe actif Lien	Polymères, Protéines Taille : de 3 à 20 nm
Micelles polymériques	 Couronne Coeur	Lipides amphipathiques, 20 à 50 nm
Emulsions	 Emulsifiant Solvant aqueux Huile Chaine hydrocarbonée Groupement polaire	De 50 nm à 1 µm
Cyclodextrines		~70 nm

Tableau I.13 : Les différents types de nanovecteurs.

4. Les nanovecteurs sur le marché

Les principaux nanovecteurs sur le marché sont les liposomes. C'est en 1990 que la première formulation liposomale a reçu l'agrément pour une application clinique. Il s'agit d'une forme liposomale de l'amphotéricine B (Ambisome®) pour le traitement des infections fongiques. Dans le domaine du traitement contre le cancer, la première formulation à recevoir l'agrément fut la formulation liposomale de doxorubicine commercialisée sous le nom de Doxil® aux Etats Unis et de Caelyx® en Europe [Gabizon *et al.*, 2012]. Actuellement, de nombreux médicaments anticancéreux traditionnels ont été testés sous forme liposomale. Beaucoup d'entre eux ont fait l'objet d'essais cliniques. Ce mode de formulation des agents chimiothérapeutiques est en pleine expansion, le Tableau I.14 présente les formulations déjà commercialisées.

Nom	Principe actif	composition Lipidique (ratio molaire)	Indications
Ambisome	Amphotéricine B	HSPC : DSPG : CHOL : amphotéricine B (2:0.8:1:0.4)	Infections fongiques sévères
Abelcet	Amphotéricine B	DMPC: DMPG (7:3)	Infections fongiques sévères
Amphotec	Amphotéricine B	Cholesteryl sulfate	Infections fongiques sévères
DaunoXome	Daunorubicine	DSPC : CHOL (2:1)	Tumeurs du sang (leucémie)
Doxil / caelix	Doxorubicine	HSPC : CHOL: PEG 2000-DSPE (56:39:5)	Sarcome de kaposi, Cancer des ovaires et du sein
Lipo-dox	Doxorubicine	DSPC : CHOL: PEG 2000-DSPE (56:39:5)	Sarcome de kaposi, Cancer des ovaires et du sein
Myocet / Evacet	Doxorubicine	EPC : CHOL (55:45)	En association avec le cyclophosphamide dans les cancers du sein métastatique
Visudyne	Verteporfine	EPG : DMPC (3:5)	Myopie pathologique, dégénérescence maculaire lié à l'âge, histoplasmose oculaire
Depocyt	Cytarabine	CHOL: Trioléine: DOPC : DPPG (11:1:7:1)	Méningites néoplasiques et méningites lymphomateuses
DepoDur	Morphine sulfate	CHOL: Trioléine : DOPC : DPPG (11:1:7:1)	soulagement de la douleur
Epaxal	Virus de l'hépatite B inactivée (souche RG-SB)	DOPC and DOPE	Hépatite A
Inflexal V	Hémagglutinines inactivée du virus influenza souche A et B	DOPC and DOPE	Grippe

Tableau I.14 : Formes liposomales commerciales [Immordino *et al.*, 2006 ; Chang et Ye, 2012; Chang *et al.*, 2012].

Mis à part les liposomes, seule une forme du paclitaxel conjugué à l'albumine (Abraxane) est actuellement sur le marché pour le traitement des cancers du sein métastatiques.

5. Les nanovecteurs en développement clinique

5.1 Les liposomes

Des liposomes déjà sur le marché font l'objet d'essais cliniques dans le cadre d'autres applications, mais il existe également des formes nouvelles qui sont évaluées. Le Tableau I.15 présente une liste non exhaustive des formulations liposomales faisant l'objet d'études cliniques [pour revue Slingerland *et al.*, 2012; Chang et Yeh, 2012 ; Immordino *et al.*, 2006]. Il est important de noter que seulement 3 formulations sur 12 sont commercialisées dans le domaine du cancer alors que la majorité des études cliniques actuelles sont dans ce domaine.

Nom	Composition	Principe actif	Applications	Statut
LEP-ETU	DOPC : CHOL : cardiolipine (90:5:5)	paclitaxel	Cancers ovarien, mammaire et des poumons	Phase I
LEM-ETU	DOPC : CHOL : cardiolipine (90:5:5)	Mitoxantrone	leucémie, cancers du sein, de l'estomac, du foie et des ovaires	Phase I
EndoTAG-1	DOTAP : DOPC : Paclitaxel (50:47:3)	Paclitaxel	propriétés anti-angiogénique, cancer du sein	Phase II
EndoTAG-2	DOTAP	Camptothécine	Cancer métastatique	Précliniqu e
Arikace	DPPC : CHOL	Amikacine	infections pulmonaire	Phase III
Marqibo®	DSPPC/CHOL/sphingosin e	Vincristine	Non-Hodgkin's lymphoma	Phase II / III
ThermoDox	DPPC :MSPC : PEG 2000-DSPE (90:10:4)	Doxorubicine	cacinome hepatocellulaire non resecable	Phase II
Atragen®	DMPC : soybean oil	T-rétinoïque acide	Cancer avancé du rein, leucémie pro myélocitaire aigue	Phase I / II
T4N5 liposome lotion	—	Bactériophage T4 endonucléase	Xeroderma Pigmentosum	Phase III
Liposomal Grb-2	—	Nucleoside antisens GRb2	leucémies myeloides aigues, leucémies myelogènes chroniques leucémies lymphoblastiques aigues	Phase I
Nyotran®	DMPC : DMPG : CHOL	Nystatine	Infections fongiques (patients immunodéprimés)	Phase II/III
LE-SN38	DOPC : CHOL : cardiolipine	Irinotecan	Cancers avancés, cancer colorectal métastatique	Phase I
Aroplatin	DMPC : DMPG	Analogue de l'oxaliplatine	Cancer colorectal	Phase II
Liprostin	—	Prostaglandine E1	Maladie du système vasculaire périphérique	Phase II
Stimuvax	—	BPL25, peptide ciblant MUC1	vaccin immun contre cancer du poumon a non petites cellules	Phase II
SPI-077	SHPC : CHOL : DSPE- PEG	Cisplatine	Cancer du poumon, cancer de la tête et du coup	Phase I/II
Lipoplatin ™	SPC : DPPG : CHOL	Cisplatine	différents types de cancer	Phase II/III
S-CKD602	liposome pegylé Belotecan	Analogue de la camptothécine	Différents types de cancers	Phase I
OSI-211	SHPC :CHOL	Lurtotecan	Ovarian cancer Head and neck cancer	Phase II
INX-0125	DSPPC :CHOL :sphingosine	Vinorelbine	Cancers du sein, côlon et poumon	Précliniqu e / Phase I
INX-0076	DSPPC :CHOL :sphingosi ne	Topotecan	Cancers avancés	Précliniqu e
Liposomal- Annamycin ®	DSPC : DSPG: Tween	Annamycine	cancer du sein	Phase II
MBT-0206	DOPE : DO- trimethyl ammoniumpropane	Paclitaxel	propriétés anti-angiogénique, cancer du sein	Phase I
Liposome oxaliplatine MBP-426	NGPE-liposomes - transferrine	oxaliplatine	Adenocarcinome gastrique, gastroesophagien ou oesophagien	II

Tableau I.15: Liposomes en développement clinique [Slingerland *et al.*, 2012; Chang et Yeh, 2012; Immordino *et al.*, 2006].

5.2 Les autres types de nanovecteurs en développement

D'autres types de nanovecteurs ont été évalués au cours de tests précliniques et cliniques. Quelques exemples d'utilisation de ces vecteurs sont présentés ci-dessous (Tableau I.16).

Nom	Type	Principe actif	Statut	Applications
Nanoplatin NC-6004	Micelle	Cisplatine	I/II	Cancer du pancréas
Anticorps conjugué au hRS7-SN38 IMM-132	Anticorps conjugué au SN38	7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)	I	Cancer épithélial avancé
Conjugué ciblant le récepteur au folate vinca alkaloid/mitomycine C EC0225	Conjugué ciblant le récepteur au folate	Vinca-alkaloïde et mitomycine C	I	Tumeur réfractaire ou métastatique
Conjugué Anticorps monoclonal anti-prostate-spécifique MMAE	Conjugué Anticorps anti PSMA –MMAE-auristatine	Inhibiteur des microtubules	I	Cancer de la prostate
Polymère camptothécine XMT-1001	Conjugué au polymère poly[1-hydroxyméthylène hydroxyméthyl formyl] (PHF)	Camptothécine	I	Tumeurs solides avancées, cancer avancé des cellules rénales
nab- rapamycin ABI-009	Conjugué albumine	Rapamycine	I	Cancer avancé non hématologique
Tenifatecan SN2310	Emulsion	7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)	I	Tumeurs solides avancées
Emulsion de vinorelbine tartrate ANX-530	Emulsion	Vinorelbine	I	Tumeurs solides avancées
Cyclodextrine-camptothécine CRLX101 / IT-101	Cyclodextrine	Camptothécine	II	Tumeurs solides avancées, Cancer non à petites cellules, cancer ovarien, cancer avancé des cellules rénales
1,4-beta-D-galactomannan (davanat 5fu)	Polymère glucidique	5 Fluorouracile (5FU)	I	Tumeurs solides avancées
Transferrin receptor-targeted anti-RRM2 siRNA CALAA-01	Nanoparticule-Transferrine	Anti-RRM2 siRNA	I	Tumeurs solides avancées

NPs : nanoparticules, MMAE monométhylauristatine E

Tableau I.16 : Exemples de nanomédicaments pour le cancer en développement clinique [<http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

Trois molécules ont été plus particulièrement encapsulées ou associées à des vecteurs : la doxorubicine, le docétaxel et le paclitaxel.

La doxorubicine est l'un des premiers anti-cancéreux à avoir été formulé. Cet agent est une anthracycline isolé de la bactérie *Streptomyces peucetius var. caesius*. La doxorubicine s'intercale entre les paires de bases de la double hélice d'ADN empêchant de ce fait la réplication de l'ADN et ultérieurement la synthèse de protéines. Cependant, elle produit également des radicaux libres d'oxygène qui induisent une toxicité vasculaire cardiaque et cutanée. Des formulations de cette molécule ont donc été développées pour limiter ces effets secondaires. Une forme liposomale de cette molécule est commercialisée aux Etats Unis sous le nom de Doxil depuis novembre 1995 et en Europe sous le nom de Caelix depuis juin 1996. Les formulations en cours d'essai clinique sont listées Tableau I.17.

Nom	Type	Statut	Applications
Microsphères de doxorubicine	Microsphère de polyvinylalcool	II/III	Carcinome hépatocellulaire, métastases hépatique de mélanome
Conjugué doxorubicine-GnRH AEZS-108	Conjugué au peptide gnRH-1R	I/II	Cancer urothélial, tumeurs gynécologique, cancer de la prostate résistant avec métastases
Conjugué doxorubicine-HPMA P(GFLG)-ADR PK1	Conjugué au N-(2-hydroxypropyl méthacrylamide (HPMA)	II	Cancer du sein et colorectal avancé, cancer de poumon à non petites cellules
Complexe doxorubicine magnétique DOX-MTC	Microsphère magnétiques (carbone et fer)	II	Carcinome hépatocellulaire
NPs-doxorubicine (Livatag) BA-003	Nanoparticule	III	Carcinome hépatocellulaire
Liposome doxorubicine HCl TLC D-99 (doxil, caelix)	Liposome pegylé	III/IV	Cancer du sein métastatique, carcinome ovarien et péritonéal, myelome multiple

Tableau I.17: Formulations de la doxorubicine en cours d'essai clinique [<http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

Le docétaxel est un taxane semi synthétique dérivé d'un composé naturel extrait de l'arbre *Taxus baccata*. Ce composé de la classe des poisons du fuseau, inhibe également des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Les formulations de docétaxel peuvent augmenter la stabilité du composé et améliorer son efficacité. La formulation de cet agent est susceptible de réduire les effets délétères en évitant l'utilisation de détergents toxiques, comme le polysorbate 80 utilisé pour la solubilisation du docétaxel dans sa forme non formulée, mais également en augmentant sa distribution dans le tissu cible. Différents types de formulations sont actuellement évalués dans des essais cliniques, ceux-ci sont répertoriées dans le Tableau I.18.

Nom	Type	Statut	Applications
nab-docetaxel ABI-008	Nanoparticul e albumine	I/II	Cancer de la prostate réfractaire aux hormones
Docetaxel-PNP	Nanoparticul epolymériqu e	I	Tumeurs solides avancées
Emulsion docetaxel ANX-514	Emulsion	I	Tumeurs solides avancées
Microsphère lipidique de docetaxel DT-LM	Emulsion	I	Tumeurs solides avancées
Liposome-docetaxel LE-DT	Liposome	II	Cancer pancréatique local avancé

Tableau I.18 : Formulations du docetaxel en cours d'essai clinique [<http://www.cancer.gov/drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

Le **paclitaxel** est un composé extrait de l'if du Pacifique *Taxus brevifolia* possédant une activité antinéoplasique. Cette molécule se lie à la tubuline et inhibe la dépolymérisation des microtubules, aboutissant ainsi à l'inhibition de division cellulaire. Cet agent induit également l'apoptose en se liant et en bloquant la fonction de la protéine inhibitrice de l'apoptose Bcl-2 (B-cell Leukemia 2) [NCI Drug Dictionary, <http://www.cancer.gov/drugdictionary>]. Différentes formulations permettent la solubilisation du paclitaxel sans l'utilisation de Cremophor, permettant ainsi l'administration de plus grandes doses de paclitaxel en évitant les effets toxiques associés au Cremophor [NCI Drug Dictionary, <http://www.cancer.gov/drugdictionary>]. Différentes formulations ont fait l'objet d'essais cliniques telles que la forme micelle, conjugué, polymère, émulsion, liposome et nanoparticule (Tableau I.19). Une forme conjuguée à l'albumine est commercialisée sous le nom d'Abraxane depuis juillet 2005 aux Etats Unis et depuis janvier 2008 en Europe.

Nom	Type	Statut	Applications
Genexol-PM	Micelle	II	Cancer du poumon non à petites cellules, Carcinome métastatique du pancréas
Nab paclitaxel (Abraxane) ABI-007	Conjugué à l'albumine	II/III	Cancer du sein métastatique, tumeurs solides, myélome multiple réfractaire, cancer du poumon, mélanome
Paclitaxel poliglumex (PG-TXL, Xyotax) CT-2103	Polymère polyglutamate	III	Cancer du poumon non à petites cellules, cancer ovarien épithélial récurrent, carcinome péritonéal primaire, cancer du sein métastatique, cancer de la prostate, tumeur du cerveau, cancer colorectal métastatique
Tocosol Paclitaxel S-8184	Emulsion vitamine E	II	Cancer du sein métastatique, carcinome de l'urothélium
Concentré Paclitaxel nanodispersé PICN-NPs	Nanoparticule	I	Cancer solides avancés
Liposome paclitaxel (LE P-ETU) PNU-93914	Liposome	I/II	Cancer solides avancés, Cancer du sein métastatique

Tableau I.19 : Exemples de formulations du paclitaxel en d'essai clinique [<http://www.cancer.gov / drugdictionary>; <http://clinicaltrials.gov/>].

IV. OBJECTIFS DES TRAVAUX

Nous venons de voir que le cancer est un problème de santé publique avec 365 000 nouveaux cas de cancers estimés en France en 2011. Nous avons également vu que les thérapies vectorisées sont plus spécifiques que les chimiothérapies traditionnelles et que l'imagerie est importante dans le diagnostic et le suivi thérapeutique. Dans ce contexte, notre équipe a pour but de concevoir des nanovecteurs pour l'imagerie ou la délivrance ciblée de médicaments. La thématique d'imagerie concerne aussi bien le suivi des vecteurs par imagerie que la conception de sondes spécifiques telles des microbulles pour l'échographie ou des agents de contraste IRM nanoparticulaires. La délivrance de médicaments couvre des formulations dédiées à l'administration locale (formes liquide/gel mucoadhésives) ou systémique (liposomes, émulsions multiples). Dans ce contexte cette thèse de doctorat comporte deux objectifs :

- Développer des modèles pré-cliniques appropriés pour le ciblage passif et actif des tumeurs ;
- Mettre au point une forme d'administration systémique de la fisétine, un agent anti-angiogénique et l'évaluer sur les modèles mis en place.

Choix, développement et caractérisation de modèles murins

Sélection des tumeurs

Nous avons évalué la densité vasculaire sur 15 lignées tumorales couramment utilisées afin de déterminer le meilleur modèle pour une stratégie antivasculaire ou anti-angiogénique. L'expression des intégrines $\alpha\beta3$ et de la sélectine-E a été testée dans le but de déterminer le modèle le plus approprié pour un ciblage actif de ces molécules antivasculaire ou anti-angiogénique. Ces travaux sont décrits dans l'article 1 : « *Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours* » publié dans *Tumor biology* et présenté p. 71.

Développement et caractérisation d'un modèle orthotopique

Le criblage de ces molécules d'adhésion cellulaire a été réalisé sur des tumeurs implantées par voie sous-cutanée (ectopique). Ces modèles animaux simples permettent d'avoir une bonne idée de l'efficacité d'anticancéreux ou de la distribution de liposomes. Cependant, certains anticancéreux efficaces sur ce type de modèle ne le sont pas sur des tumeurs implantées dans leur site originel (orthotopique). De plus, le site d'implantation tumoral peut influencer la biodistribution de liposome et

donc l'efficacité du principe actif qu'il véhicule. Nous avons sélectionné la tumeur côlon 26 de notre étude précédente, car elle exprimait à la fois les intégrines $\alpha\beta3$ et la sélectine-E. Afin d'être plus prédictif, le développement d'un modèle orthotopique de cancer colorectal C26 a été réalisé. La caractérisation par différentes modalités d'imagerie de ce modèle implanté en ectopique et en orthotopique est décrite dans l'article 2 : « *Characterization of ectopic and orthotopic colon carcinoma C26 using non invasive imaging modalities in mice* » soumis à *European Journal of Cancer* et présenté p. 88.

Ces modèles développés précédemment sont utiles pour tester la distribution de nouvelles formulations liposomales et évaluer des molécules à potentiel anti-angiogénique comme la fisétine.

Application thérapeutique

Développement d'une formulation pour l'injection in vivo

La fisétine, molécule de la famille des flavonoïdes a montré des propriétés anti-angiogéniques lors de criblages cellulaires. La forme d'administration de celle-ci ne permettant pas une bonne solubilisation, une encapsulation au sein d'un liposome a été envisagée. L'optimisation de cette formulation pour l'administration chez la souris et la production en grande quantité de cette forme a été réalisée. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article 3 intitulé : « *Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin* » publié dans *International Journal of Pharmaceutics* et présenté p.144.

Evaluation sur un modèle de carcinome pulmonaire de Lewis

Une formulation liposomale optimale de la fisétine ayant été déterminée, le potentiel de celle-ci à induire une diminution de la croissance tumorale a été évalué chez les souris porteuses de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC). Ces résultats sont décrits dans l'article 4 « *Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy* » soumis à *Journal of Controlled Release* et présenté p. 164.

CHAPITRE II : LES MODELES DE TUMEURS MURINES ET LEURS CARACTERISATIONS

I.	LES MODELES PRECLINIQUES EN CANCEROLOGIE	63
1.	Les modèles de tumeurs <i>In situ</i>	63
2.	Modèles implantés.....	64
3.	Apports des modèles murins	65
4.	Choix du bon modèle.....	66
II.	DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN POUR LE CIBLAGE TUMORAL	67
1.	Objectifs des travaux	67
2.	Caractérisation de modèles de tumeurs murines (mise au point préliminaire).....	67
3.	Sélection de la lignée tumorale (Article 1)	68
4.	Caractérisation du modèle choisi par imagerie (Article 2).....	69
III.	VASCULAR DENSITY AND ENDOTHELIAL CELL EXPRESSION OF INTEGRIN ALPHA V BETA 3 AND E-SELECTIN IN MURINE TUMOURS	71
1.	Introduction	72
2.	Materials and methods	73
3.	Results.....	74
4.	Discussion	80
IV.	CHARACTERIZATION OF ECTOPIC AND ORTHOTOPIC COLON CARCINOMA C26 USING NON INVASIVE IMAGING MODALITIES IN MICE.....	88
1.	Introduction	90
2.	Materials and Methods	91
3.	Results.....	95
4.	Discussion	103
5.	Conclusions	105
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	108
1.	La vascularisation des tumeurs	108
2.	Les intégrines $\alpha\beta 3$	109
3.	Sélectine-E	111
4.	Etude de la croissance des tumeurs côlon C26.....	113

I. LES MODELES PRECLINIQUES EN CANCEROLOGIE

Il existe principalement deux classes de modèles de cancer, les modèles implantés et les modèles *in situ*. Pour des raisons pratiques, les modèles de tumeurs implantées sont ceux qui sont les plus utilisés pour évaluer l'activité antitumorale, alors que les modèles *in situ* fournissent une information sur l'étiologie du cancer [McConville *et al.*, 2007]. Les modèles *in situ* se sous-divisent en 2 groupes qui correspondent à la méthode d'induction utilisée pour obtenir les tumeurs. Les modèles implantés se différencient par l'espèce d'origine de la greffe tumorale (syngénique ou xenogénique) et le site d'implantation des cellules s'il correspond à son site d'origine ou non (orthotopique ou ectopique) (Figure II.1).

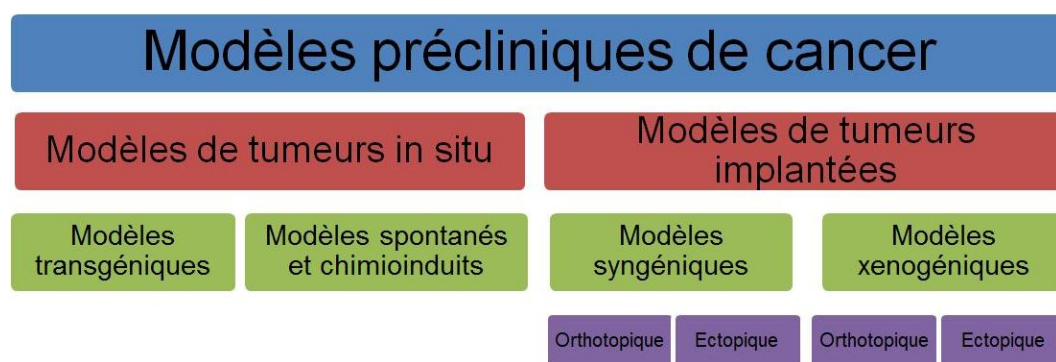


Figure II.1 : Représentation schématique des différentes catégories de modèles de cancer utilisés en préclinique [McConville *et al.*, 2007].

1. Les modèles de tumeurs *In situ*

Cette classe regroupe les modèles de tumeurs spontanées, chimio-induites et transgéniques. Ils sont regroupés sous le terme *in situ* car la tumeur se développe à son emplacement originel.

1.1 Modèles spontanés et chimio-induits de cancer

Les modèles spontanés et chimio-induits sont les plus anciens modèles décrits dans la littérature.

La formation spontanée de tumeur chez la souris a une incidence très faible et la formation des tumeurs est généralement lente et irrégulière [Chandra et Frith, 1992], ce qui rend ce type de modèle difficilement utilisable pour l'évaluation de l'efficacité d'anticancéreux. Cependant, ce type de modèle permet l'étude du développement des cancers [McConville *et al.*, 2007]. Différents carcinogènes peuvent être utilisés et certains paramètres tels que le dosage, la durée, la voie, la

fréquence d'administration, le sexe, l'âge et enfin le patrimoine génétique de la souris influencent le taux de prise des tumeurs.

1.2 Les modèles transgéniques

Les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier la manière dont un gène affecte la progression d'une maladie et de découvrir le rôle et les fonctions d'un gène d'intérêt. Les souris transgéniques offrent une analyse plus précise d'une maladie ou d'un traitement puisqu'elles peuvent tenir compte des facteurs génétiques et de l'environnement. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, 4 classes de gènes influent sur la carcinogenèse : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur, les gènes régulateurs de l'apoptose et les gènes réparateurs des dommages de l'ADN. Des modifications dans ces classes de gènes sont susceptibles d'induire une tumeur. Une fois le modèle établi, le développement de la tumeur est très lent et irrégulier. Par exemple les souris P53+/- peuvent développer une tumeur en 7 à 17 mois [Donehower *et al.*, 1992]. Ces modèles sont donc surtout utilisés pour déterminer l'influence d'un gène sur le développement tumoral.

2. Modèles implantés

Ces modèles ont été réalisés à partir de tumeurs spontanées ou induites qui ont été adaptées par différents passages *in vivo* sur la même souche de souris. Historiquement, les principaux investigateurs de ce type de modèle sont entre autre Fidler, Griswold et Corbett [pour ex. Fidler, 1973 ; Griswold et Corbett, 1975 ; Corbett *et al.*, 1975] .

Pour ce type de modèle, deux sites d'implantations sont possibles, un site sous-cutané (ectopique) et un site dans le tissu originel de la tumeur (orthotopique). Ces modèles présentent un inconvénient en termes d'homogénéité du matériel. Cependant, ils sont peu coûteux et faciles à réaliser, et leur temps de doublement (Td) est généralement inférieur à 3 jours.

2.1 Le modèle ectopique

C'est le modèle le plus fréquemment utilisé : on procède par injection sous-cutanée de cellules tumorales ou par implantation de fragments tumoraux à l'aide d'un trocart. Le suivi de la progression tumorale sur ces modèles est facilement réalisable, sans technique d'imagerie, ce qui facilite les essais thérapeutiques.

Cependant, la différence de microenvironnement peut induire des effets thérapeutiques artéfactuels [Heijstek *et al.*, 2005; Pocard *et al.*, 1996]. Par exemple, il a été décrit que des cancers du côlon implantés en sous-cutané sont plus sensibles à la doxorubicine que ceux implantés sur le cæcum d'une souris [Wilmanns *et al.*, 1992]. Un autre exemple significatif est celui décrit par MacDonald où la stratégie thérapeutique utilisant un antagoniste des intégrines $\alpha\beta3$ n'est efficace que dans le cas d'une tumeur orthotopique, soulignant le rôle essentiel du microenvironnement tumoral [MacDonald *et al.*, 2001].

2.2 Le modèle orthotopique

Ce modèle est réalisé par implantation d'un fragment tumoral ou injection de cellules dans son environnement d'origine [Fidler *et al.*, 1994 ; Killion *et al.*, 1998]. Il est largement admis que les modèles orthotopiques préservent mieux différents aspects de la biologie des tumeurs par rapport au modèle ectopique, notamment la conservation des structures entourant la tumeur, la croissance vasculaire et le potentiel métastatique [Fidler, 1986].

Cependant ce type de modèle nécessite le recours à la chirurgie qui diminue fortement le taux de prise tumorale et augmente la variabilité de croissance des implants [McConville *et al.*, 2007]. Le développement de techniques d'imagerie a permis de pallier certains inconvénients, telles la difficulté d'accès et de mesure de l'évolution tumorale, ainsi que la nécessité de sacrifier l'animal. Ceci a fait l'objet d'une étude décrite dans l'article « *Characterization of ectopic and orthotopic colon carcinoma C26 using non invasive imaging modalities in mice* » que nous aborderons plus loin dans ce chapitre.

3. Apports des modèles murins

Malgré le développement de cultures de cellules en 3 dimensions (sphéroïdes) qui permettent la réalisation d'études dans un contexte multicellulaire [Ivascu et Kubbies, 2006], il reste indispensable de disposer de modèles *in vivo*. En effet, les modèles murins permettent de réaliser des études dans un milieu complexe relativement proche de celui rencontré chez l'homme. Si l'on se place dans le cadre d'études sur le cancer, seules des expériences chez l'animal permettent une meilleure compréhension des mécanismes de dissémination métastatique qui est pour la plupart des cancers la première cause de mortalité [Liotta et Rao, 1986]. De plus, la mise au point de nouvelles thérapies ainsi que l'évaluation de techniques

émergentes telles que de nouvelles méthodes d'imagerie, peuvent être évaluées et validées uniquement *in vivo* [Genne, 2002].

4. Choix du bon modèle

Il est crucial de choisir le meilleur modèle pour chaque expérience afin de résoudre une question expérimentale spécifique [Heijstek *et al.*, 2005]. Depuis quelques d'années, le nombre de modèles tumoraux augmente et se complexifie afin de tenter d'expliquer les différents aspects de la carcinogénèse. Parmi ces modèles, les implantations orthotopiques de tumeurs humaines et l'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées sont très proches de la pathologie humaine et permettent l'affinement des techniques expérimentales [Curwen et Wedge, 2009]. L'implantation de tumeurs de patients chez la souris est à ce titre le modèle qui permet de conserver les meilleures caractéristiques en termes de signalisation cellulaires et de dérive génétiques.

Nous avons choisi de développer au sein du laboratoire des modèles de tumeurs implantées. Ces modèles précliniques ont l'avantage de servir de première étape pour définir la biodisponibilité d'un agent thérapeutique, déterminer sa dose maximale tolérée, optimiser sa voie d'administration et fournir ainsi une base pour de futures études cliniques [Sausville et Burger, 2006].

Parmi les modèles implantés, nous avons choisi de développer des modèles syngéniques. En effet, ces modèles de tumeurs, malgré leur caractère murin restent de bons modèles car l'environnement tumoral correspond à celui de l'hôte. Ceci est important en particulier pour évaluer des thérapies qui demandent une réponse immunitaire ou le ciblage spécifique de composants des vaisseaux tumoraux ou de la matrice extracellulaire [Burger et Fiebig, 2002].

II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN POUR LE CIBLAGE TUMORAL

1. Objectifs des travaux

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, certaines molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) exprimées par les vaisseaux jouent un rôle central dans l'initiation et la progression tumorale et sont de ce fait intéressantes dans le cadre de thérapie ciblée ou d'imagerie des tumeurs. Les études de notre équipe portent sur la conception de vecteurs de taille nanométrique pour la délivrance ciblée d'agents anticancéreux et/ou de sondes d'imagerie. Pour cette stratégie nous avons choisi le ciblage de la vascularisation et notamment de 2 molécules d'adhésion cellulaire importantes dans l'angiogenèse : l'intégrine $\alpha\beta3$ et la sélectine-E. Pour cela, afin de choisir un modèle approprié, nous avons préalablement déterminé parmi un panel d'une quinzaine de tumeurs, celles qui étaient les plus vascularisées, et celles qui exprimaient le plus l'intégrine $\alpha\beta3$ et la sélectine-E. Puis, nous avons développé et caractérisé le modèle choisi en fonction de son site d'implantation ectopique ou orthotopique.

2. Caractérisation de modèles de tumeurs murines (mise au point préliminaire)

Pour la détection des différentes CAMs (PECAM-1, intégrine $\alpha\beta3$ et sélectine-E), nous avons utilisé une méthode d'immuno-marquage par la peroxydase. Différents paramètres influant sur cette technique (anticorps utilisé, concentration, temps d'incubation...) et la présence des marqueurs étant peu documentés pour les tumeurs testées, nous avons mis au point notre test sur un modèle d'inflammation aigüe (induites au lipopolysaccharide, LPS) et en particulier sur cryo-coupes de poumon. Le poumon a été choisi car c'est un organe qui possède un nombre très élevé de macro et micro-vaisseaux [Muller *et al.*, 2002]. L'induction préalable au LPS était nécessaire car elle assure une inflammation et donc une surexpression des intégrines $\alpha\beta3$ et sélectines-E.

Pour ces tests nous avons utilisé des anticorps monoclonaux. La vascularisation a été détectée à l'aide d'un anticorps CD31 (PECAM-1), les sélectines-E par un anticorps CD62E. L'intégrine $\alpha\beta3$ ne pouvant être détectée chez la souris par le même anticorps, nous avons donc détecté séparément la fraction α par l'anticorps CD51 et la fraction $\beta3$ par l'anticorps CD61. Après quelques essais nous avons obtenu les résultats présentés Figure II.2. Les marquages ont permis la

détection des cellules endothéliales (Figure II.2-A), des intégrines fraction αv (Figure II.2-B) et $\beta 3$ (Figure II.4-C), ainsi que les sélectines-E (Figure II.2-D).

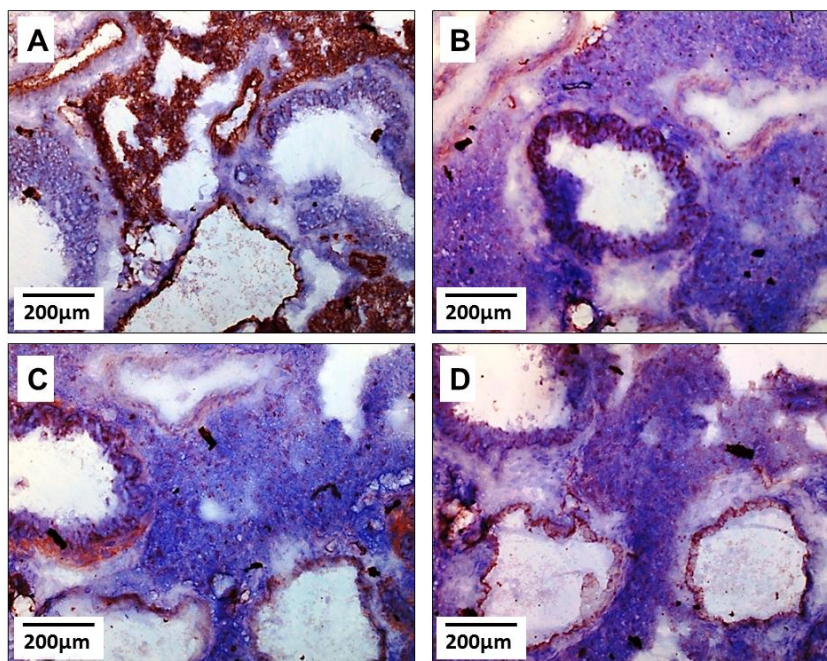


Figure II.2 : Mise au point du marquage immuno-histochimique sur un modèle d'inflammation aigüe induite au LPS.

Les CAMs sont en brun sur les images et le noyau des cellules a été coloré avec l'hématoxyline. Grossissement 200X.

Lors de ces essais sur coupe de tumeur, l'anticorps CD51 initialement préparé pour le western blot ne permettait pas la détection de faible quantité de fraction αv des intégrines. Nous avons donc décidé de réaliser les tests en ne détectant que la fraction $\beta 3$. Il est à noter que cette fraction $\beta 3$ est plus spécifique de la progression tumorale et du processus métastatique que la fraction αv [Albelda *et al.*, 1990 ; Natali *et al.* 1997].

3. Sélection de la lignée tumorale (Article 1)

Dans cette première étude, nous avons voulu déterminer le modèle le plus approprié pour tester nos stratégies de ciblage thérapeutique. Pour ce faire, 15 tumeurs murines ont été sélectionnées, comme le mélanome (B16), les tumeurs coliques (C26, C38, C51), mammaires (MA13, MA16, MA16/Adr, MA17, MA17/Adr, MA25, MA44), et pancréatiques (PO2, PO3), le sarcome osteogénique de Glasgow (GOS) et le carcinome pulmonaire de Lewis (LLC).

Dans cette série, nous avons obtenu une vascularisation faible (<5 %) pour le mélanome B16 et moyenne (5-15 %) pour les tumeurs mammaire et colique. Les tumeurs pancréatiques, le sarcome GOS ainsi que le carcinome pulmonaire de

Lewis ont été observées comme les tumeurs les plus vascularisées, avec un taux supérieur à 15 %. Nous avons détecté une expression de la fraction $\beta 3$ des intégrines pour 7 tumeurs testées (B16, C26, MA17/Adr, MA25, MA44, PO2, LLC). L'expression de la sélectine-E a été détectée sur seulement 4 tumeurs sur 15. Il est important de noter que seulement deux tumeurs expriment les deux molécules d'adhésion cellulaire : le modèle de mélanome B16 et le modèle de carcinome de côlon C26.

Ce criblage était important car il nous a permis de sélectionner des modèles d'intérêt pour le ciblage nanoparticulaire de l'endothélium tumoral. Pour la suite de nos études, nous avons choisi la tumeur côlon 26 car elle est moyennement vascularisée et exprime les deux molécules d'adhésion cellulaire que sont les intégrines $\alpha\beta 3$ et la sélectine E. De plus, le développement d'un modèle de côlon en orthotopique est documenté et a déjà été réalisé sur cette tumeur murine [Endo *et al.* 2002]. Parmi les tumeurs les plus vascularisées, la lignée de carcinome pulmonaire de Lewis LLC a également été retenue pour l'évaluation de molécules à potentiel antivasculaire.

4. Caractérisation du modèle choisi par imagerie (Article 2)

Après avoir choisi notre modèle d'étude, la mise en place d'un modèle orthotopique de carcinome de côlon C26 sur les souris Balb/c a été réalisée. L'implantation de fragments tumoraux a été effectuée sur le cæcum. La technique d'implantation a été maîtrisée et a permis d'obtenir un taux de prise tumorale de 100 %. Une optimisation du protocole a permis de réduire le taux de mortalité suite à la chirurgie (inférieur à 10 %).

Une fois cette mise au point effectuée, nous avons comparé l'influence du site d'implantation tumoral (ectopique versus orthotopique) sur la croissance et la densité vasculaire. Nous avons ensuite réalisé le suivi des tumeurs orthotopiques et ectopiques par IRM, imagerie ultrasonore et imagerie optique. Cette évaluation a été réalisée dans le but de mieux connaître notre modèle d'étude et de déterminer la technique d'imagerie la plus appropriée pour le suivi de la croissance tumorale dans le cadre d'un essai thérapeutique.

Lors de cette caractérisation, nous avons observé une croissance tumorale plus rapide du modèle orthotopique par rapport au modèle ectopique. Une répartition relativement homogène des cellules tumorales et des cellules endothéliales dans les deux modèles d'étude a été obtenue par histologie. Lors de l'observation du réseau

vasculaire superficiel des tumeurs par spectrofluorescence, de nombreux vaisseaux tortueux et non structurés ont été observés. Cependant, des zones plus structurées ont été mises en évidence dans modèle orthotopique.

Le suivi de la croissance par imagerie optique n'a pas donné les résultats attendus. En effet, le suivi de la croissance tumorale n'a pu être effectué que pendant les 8 premiers jours, et uniquement dans le cas du modèle ectopique.

En revanche, les techniques d'IRM et d'échographie sont parfaitement appropriées pour le suivi de la croissance tumorale chez la souris. Nous noterons toutefois que le suivi par échographie est plus aisé et rapide, mais ne permet pas d'obtenir une information en 3 dimensions.

Ci-après nous présenterons les deux articles correspondant à ces travaux (le 1^{er} publié dans *Tumor biology* et le 2^{ème} soumis à *European Journal of cancer*). Une conclusion générale de ces recherches ainsi que quelques résultats complémentaires sont proposés à la suite de ces articles.

III. VASCULAR DENSITY AND ENDOTHELIAL CELL EXPRESSION OF INTEGRIN ALPHA V BETA 3 AND E-SELECTIN IN MURINE TUMOURS

Johanne Seguin,¹ Céline Nicolazzi,¹ Nathalie Mignet, Daniel Scherman and Guy G. Chabot*

¹ Both considered as first author because they contributed equally to this study.

Tumor Biology 2012, DOI: 10.1007/s13277-012-0428-x

Abstract

The endothelial cell adhesion molecules, including the integrin alpha v beta 3 ($\alpha v\beta 3$) and E-selectin, are involved in the process of angiogenesis required for tumour growth, cell migration and metastasis. The purpose of this study was to assess and compare widely used tumour models to select the ones most suitable for angiogenesis research. Fifteen murine tumours were selected including melanoma (B16), colon (C26, C38, C51), mammary (MA13, MA16, MA16/Adr, MA17, MA17/Adr, MA25, MA44), pancreatic (PO2, PO3), Glasgow osteogenic sarcoma (GOS) and Lewis lung carcinoma (LLC). The tumour vascular density, assessed using the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1; CD31) immunostaining, revealed that B16 melanoma was poorly vascularized (<5%), whereas the colon and mammary tumours were well vascularized (5-15%). The most vascularized tumours (>15%) were the pancreatic tumours (PO2 and PO3), the sarcoma (GOS) and the lung tumour (LLC). The integrin $\alpha v\beta 3$ and E-selectin evaluated by immunohistology, showed that 7/15 tumours expressed the $\alpha v\beta 3$ integrin which was homogeneously distributed on all tumour sections (B16, C26, MA17/Adr, MA25, MA44, PO2, LLC). E-selectin was expressed in 4/15 tumours and its expression was restricted to the tumour periphery. Only 2/15 tumours (B16 and C26) were shown to express both integrin $\alpha v\beta 3$ and E-selectin. In conclusion, these data not only contribute to a better understanding of the tumour biology of murine tumours, but can also guide the choice of appropriate models for antiangiogenic therapy, for selective drug delivery to tumours and the validation of tumour imaging modalities targeting these endothelial cell adhesion molecules.

Keywords: mouse tumours; vascularization; integrin alpha v beta 3; E-selectin; melanoma; colon; mammary; pancreas; sarcoma; lung

Abbreviation used: CAM, endothelial cell adhesion molecule.

1. Introduction

Angiogenesis, which is required for the growth of solid tumours and the metastatic dissemination of tumour cells, is probably the most important parameter for the control of cancer progression [1]. Angiogenesis is the formation of new capillaries from pre-existing microvessels and consists in a multi-step process, in which endothelial cells degrade their extracellular matrix, migrate into the perivascular spaces, proliferate and align to form cell-cell contacts to construct patent blood vessels (reviewed in [2]). This process is mediated by endothelial cell adhesion molecules (CAMs) represented by four principal classes: the selectins, which are transmembrane proteins subdivided in three groups E, L and P, expressed by endothelial cells, leucocytes and platelets, respectively; the integrins, which are transmembrane glycoproteins composed of two subunits α and β ; the membrane proteins immunoglobulin superfamily; and, the cadherins, mediators of cell-cell interactions [3]. These CAMs also play an important role in the process of metastasis development and migration [4, 5]. Compared to normal tissues, the expression pattern of the different CAMs vary widely between tumour types [6]. Therefore, the knowledge of specific CAM expression in tumours is of importance because it can allow a better understanding of the biology of tumour metastasis and also contribute to better predict the tumour evolution *in vivo*.

Among the CAMs, two proteins appear more particularly involved in the angiogenesis process, i.e., the integrin $\alpha v \beta 3$ ($\alpha v \beta 3$) and the E-selectin [7, 8]. The integrin $\alpha v \beta 3$ is not (or weakly) constitutively expressed in normal vascular endothelial cells, whereas it is selectively expressed on proliferating vascular endothelial cells [9] and on vascular cells in tumours [10-12]. Several studies have indeed reported the requirement of integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis [12-14]. Similarly, E-selectin is also detected at very low levels in normal adult blood vessels, but is highly expressed in newly formed tumour capillaries [15] and in activated endothelium [4, 8]. In addition, several investigators have shown that E-selectin is involved in angiogenesis [8, 16, 17]. By their angiogenic and adhesion properties, both CAMs are involved in tumour growth and metastasis and can therefore influence cancer prognosis and/or response to antiangiogenic therapy [4, 5, 18, 19].

Although the importance of angiogenesis has become central to a better understanding of the cancer process, as well as to the search for more specific treatments, it is surprising that most preclinical murine models are poorly characterized with regard to their vascular density and their expression of the

principal CAMs. This information could be helpful in order to select the best tumour models for angiogenic studies and to follow experimental therapeutic approaches.

The aim of the present study was to evaluate the vascular density of 15 frequently employed murine solid tumours using PECAM-1 (a constitutively expressed CAM; CD31), and to characterize the expression pattern of the integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ and E-selectin using immunological methods. Our results show that each tumour type possesses a unique expression pattern of CAMs that could influence the tumour biology and response to therapy.

2. Materials and methods

2.1 Mouse tumours

Mouse tumours were obtained from the Aventis Oncology Department (now Sanofi, Vitry sur Seine, France) and were maintained in the mouse strain of origin. Briefly, tumour fragments (30-60 mm³) were implanted subcutaneously using a 12 gauge trocar into the flanks of 6-week-old female mice of the appropriate mouse strain (reviewed in [20]) for a given tumour, as listed hereafter: B16 melanoma was implanted in C57Bl/6 mice [21]; colon carcinoma C26 and colon adenocarcinoma C51 in Balb/C, and C38 in C57Bl/6 [22, 23]; mammary adenocarcinomas MA13 in Balb/C, MA16/C [24], MA16/C/ADR [25], MA17, and MA17/Adr in C3H/HeN mice [26], and MA25 and MA44 in C57Bl/6; pancreatic ductal adenocarcinomas PO2 and PO3 in C57Bl/6 mice [27]; Glasgow osteogenic sarcoma GOS in C57Bl/6 mice [28]; and, Lewis lung carcinoma LLC in C57Bl/6 mice [29]. Mice were sacrificed by cervical dislocation when the tumour size reached 200 mm³, i.e., 10-20 days post-inoculation depending on tumour type. Samples of tumours (5×5×5 mm) were embedded frozen in isopentane immersed in liquid nitrogen and stored at -70°C until cutting on microtome and prepared for immunohistological analysis.

2.2 Primary antibodies used for immunostaining

Monoclonal rat antibodies anti-PECAM-1 (CD31, clone: MEC13.3), anti-E-selectin (CD62E, clone: 10E9.6) and hamster antibody anti-integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ (CD61, clone: 2C9.G2, directed against sub-unit β_3) were obtained from BDBiosciences (Le Pont de Claix, France). These antibodies were shown to cross-react with the corresponding mouse antigens. The working dilutions for immunostaining were 50-fold for anti-PECAM-1 (15.6 µg/mL) and 20-fold for anti-E-selectin (62.5 µg/mL) and

anti-integrin $\alpha\beta 3$ (250 $\mu\text{g/mL}$). Omission of the primary antibody was used for negative controls.

2.3 Immunohistological analysis

Ten-micron frozen tissue sections were placed on Superfrost Plus slides. Immunostaining of the CAMs was performed using a three-step procedure as previously described [8]. Endogenous peroxidase was inactivated with 0.3% H_2O_2 in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. Non-specific binding sites were blocked with 10% serum of the species used for the secondary antibody in PBS for 30 min. Slides were then incubated for 1 h (CD31, anti-PECAM-1) or 2 h (CD62E, anti-E-selectin and CD61, anti-integrin $\alpha\beta 3$) at 37°C in a humidified chamber with primary antibody. After 3 rinses of 5 min each, slides were incubated for 30 min with the corresponding biotinylated-secondary antibody (dilution 1/400 for the goat anti-rat antibody (0.5 mg/mL) and 1/200 (125 $\mu\text{g/mL}$) for the mouse anti-hamster antibody). After 3 rinses, slides were re-incubated with the streptavidin-conjugated peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions (dilution 1/400). The DAB (3,3'-diamino-benzidine, Sigma-Aldrich) substrate was then added for 5 to 7 min until a brown precipitate was visible. Tissues were counterstained with Gill's hematoxylin (Sigma-Aldrich) and treated with 30 mmol/L NH_4OH to generate a blue nuclear stain. Slides were dehydrated in graded ethanol solutions and xylene and mounted with Eukitt® (Sigma-Aldrich).

2.4 Immunostaining semi-quantitative analysis

The density of CAMs was expressed as a percent range of total cells, as follows: -, no staining detected; <1%, few positive cells; 1-5%, some positive cells in all tumour sections; 5-15%, positive cells observed in all fields; >15%, high density of positive cells in all fields. The immunostaining was assessed by two independent investigators in a blinded manner.

3. Results

3.1 Choice of tumour types

In this study, we investigated 15 solid murine tumours to evaluate their vascular density and to assess their expression of important molecular markers involved in angiogenesis. The tumours were chosen among the most frequently used

mouse tumour models, and also to be representative of the most frequent human tumour types. The murine tumours examined are listed in Table 1 and included 1 melanoma, 3 colon carcinomas, 7 mammary adenocarcinomas, 2 pancreatic tumours, 1 osteosarcoma and 1 lung carcinoma. Along with the tumour code names are presented the mouse strain used for propagation and the tumour main characteristics including doubling time, histological type and metastasis potential (invasiveness).

Tumour code name	Mouse strain	Td ^a (days)	Histological type	Invasiveness ^b	References
B16	C57BL/6	1.25–3.0	Epidermoid melanoma	Highly metastatic, >70 % to lungs	[20, 21, 54–56]
C26 colon	Balb/C	1.7–2	Colon carcinoma, undifferentiated	Highly metastatic, >90 % to lungs	[20, 22, 23, 57]
C38 colon	C57BL/6	2.5–4.0	Colon adenocarcinoma	Moderately metastatic, <30 % to lungs	[22, 23, 57]
C51 colon	Balb/C	2.5–4.3	Colon adenocarcinoma, mucinous, drug insensitive	Moderately to highly metastatic, >80 % to lungs and to lymph nodes	[22, 23, 26, 57]
MA13/C	Balb/C	3.4	Mammary adenocarcinoma		[24, 55]
MA16/C	C3H/HeN	1.3–2.0	Mammary adenocarcinoma	Highly metastatic, >80 % to lungs and >30 % to lymph nodes	[20, 24, 57]
MA16/C/Adr	C3H/HeN	1.1	Mammary adenocarcinoma, multidrug resistant, PgP ^c negative		[25]
MA17	C3H/HeN	1.0	Mammary adenocarcinoma		[26]
MA17/Adr	C3H/HeN	1.0	Mammary adenocarcinoma, multidrug resistant, PgP ^c positive		[26]
MA25	Balb/C		Mammary adenocarcinoma		[58]
MA44	C3H/HeN	2.0	Mammary adenocarcinoma	Highly metastatic, >90 % to lungs	[20, 55]
PO2	C57BL/6	2.2	Pancreatic ductal adenocarcinoma, drug insensitive	Highly metastatic	[27]
PO3	C57BL/6	2.2–3.5	Pancreatic ductal adenocarcinoma, drug insensitive	Metastatic	[27]
GOS	C57BL/6	1.9	Undifferentiated osteogenic sarcoma (Glasgow)	Moderately metastatic, <15 % to lungs	[28, 55, 57]
LLC	C57BL/6	1–1.7	Lung carcinoma (Lewis)	Metastatic to lungs (mostly) and kidneys	[20, 29, 59]

^aTd, tumour doubling time in days

^bMetastases from subcutaneously implanted tumour fragment

^cPgP, P-glycoprotein

Table 1. Principal characteristics of the murine tumours employed in this study

3.2 Tumour vascular density

Medium sized tumours of approximately 200 mm³ were harvested and analyzed for the endothelial expression of PECAM-1 (CD31), which correlates with vascularization. **Figure 1** illustrates the three different types of vascular density observed. The B16 melanoma presented a poor vascular density (<5%), whereas colon C26 (5-15%), and pancreatic adenocarcinoma PO2 (>15%) were well and highly vascularized, respectively. **Table 2** presents the comparison of the vascular density for the 15 tumours investigated. It is noteworthy that only the B16 melanoma was poorly vascularized, whereas all the colon and the mammary tumours were well

vascularized (5-15%). The pancreatic adenocarcinomas (PO2, PO3), sarcoma (GOS) and the lung carcinoma (LLC) were the most vascularized tumours in our study (>15%).

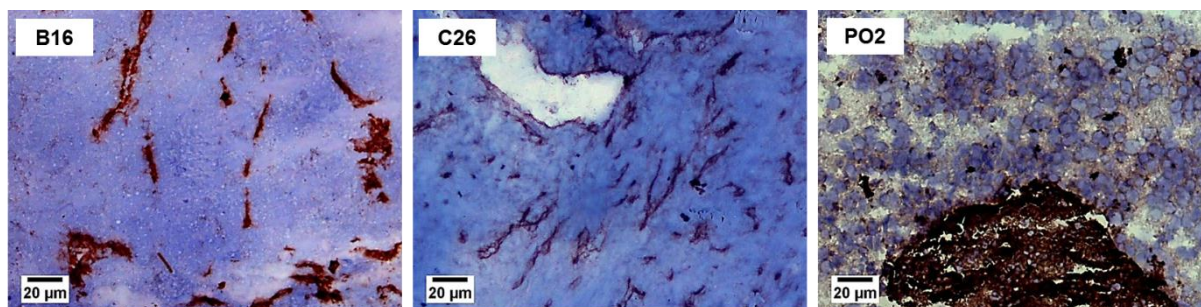


Figure 1. Vascular density in representative mouse tumours.

B16 melanoma, poorly vascularized (<5%); C26 colon carcinoma, well vascularized (5-15%); PO2 pancreatic adenocarcinoma, highly vascularized (>15%). Mouse tumour slices of 10 µm were prepared and stained using PECAM-1 (CD31) antibody as described in Materials and Methods. Original magnification $\times 100$, bar 20 µm.

3.3 Tumour vascular distribution

The vascular distribution pattern of each tumour type is presented in **Table 2**. Most tumours showed a homogeneous and regular distribution of blood vessels (colon, pancreas, sarcoma and lung). However, two tumour types presented a different profile: the B16 melanoma presented small spots with numerous vessels; and, all the mammary tumours showed a heterogeneous distribution of blood vessels.

Tumour type and name	Vascular density ^a (%)	Vascular distribution	Integrin $\alpha\beta 3$ ^b (%)	E-selectin ^c (%)
Melanoma				
B16	<5	Some small spots showing numerous vessels	<5	<5
Colon				
C26	5–15	Homogeneous distribution of vessels, some small spots with numerous vessels	<5	5–15
C38	5–15	Homogeneous distribution of vessels, some small spots with numerous vessels	–	–
C51	5–15	Homogeneous distribution of vessels, some small spots with numerous vessels	–	<5
Mammary				
MA13/C	5–15	Heterogeneous vessels distribution	–	–
MA16/C	5–15	Heterogeneous vessels distribution	–	–
MA16/C/Adr	5–15	Heterogeneous vessels distribution	–	–
MA17	5–15	Heterogeneous vessels distribution	–	–
MA17/Adr	5–15	Heterogeneous vessels distribution	<5	–
MA25	5–15	Heterogeneous vessels distribution	<5	–
MA44	5–15	Heterogeneous vessels distribution	<5	–
Pancreas				
PO2	>15	Homogeneous vessels distribution, some small spots with numerous vessels	5–15	–
PO3	>15	Homogeneous vessels distribution, some small spots with numerous vessels	–	<5
Sarcoma				
GOS	>15	Homogeneous vessels distribution	–	–
Lung				
LLC	>15	Homogeneous vessels distribution	5–15	–

Three independent samples were evaluated for each tumour type by two independent investigators, giving similar results. Tumour volumes were approximately 200 mm³

^aThe vascular density was assessed using PECAM-1 immunostaining (CD31 antibody)

^bThe expression of $\alpha\beta 3$ was assessed using CD61 antibody

^cE-selectin was assessed using CD62E antibody

Table 2: Murine tumour models vascular density and expression of endothelial cell adhesion molecules. ^a

3.4 Expression of integrin $\alpha\beta 3$ in tumours

The percent expression of positive vessels for integrin $\alpha\beta 3$ is presented in Table 2. Seven tumours expressed the $\alpha\beta 3$ integrin, although at various levels. The B16 melanoma, one colon tumour (C26), 3 mammary tumours (MA17/Adr, MA25, MA44), one pancreatic tumour (PO2) and the Lewis lung carcinoma expressed this integrin. However the $\alpha\beta 3$ integrin was expressed at higher levels in the Lewis lung carcinoma and the PO2 pancreatic adenocarcinoma. Representative photographs depicting a low expression (<5%) of $\alpha\beta 3$ in B16 melanoma, MA17/Adr, MA25 and MA44 mammary adenocarcinoma are shown in Fig. 2, whereas high expression (5–15%) is shown for the PO2 pancreatic adenocarcinoma and LLC Lewis lung carcinoma.

The distribution pattern of this integrin was however different for the expressing tumours. The MA17/Adr, MA25 and MA44 mammary adenocarcinomas expressed the $\alpha\beta 3$ integrin on some vessels distributed all over the tumour section, whereas the C26 colon carcinoma and B16 melanoma showed $\alpha\beta 3$ restricted to some areas localized at the tumour periphery. The high expression of this integrin in the LLC lung

carcinoma and the PO2 pancreatic adenocarcinoma was however distributed differently: in the LLC, $\alpha v\beta 3$ was homogeneously distributed, whereas in PO2, the expressing cells formed clusters.

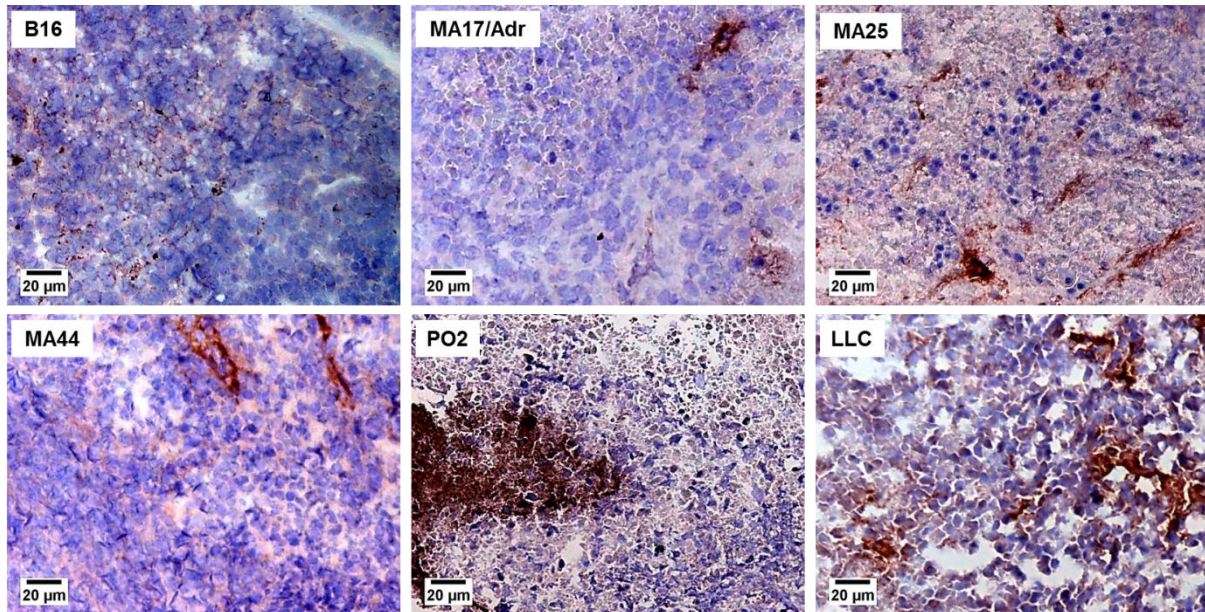


Figure 2. Expression of the $\alpha v\beta 3$ integrin in murine tumours.

B16 melanoma, MA17/Adr, MA25 and MA44 mammary adenocarcinoma show a low expression of the $\alpha v\beta 3$ integrin (<5%), whereas PO2 pancreatic adenocarcinoma and LLC Lewis lung carcinoma presented a high expression (5-15%). Mouse tumours slices of 10 μ m were stained using CD61 antibody, as described in Materials and Methods. Original magnification $\times 100$, bar 20 μ m.

3.5 Expression of E-selectin in tumours

The E-selectin expression in the various tumours is presented in Table 2. E-selectin was detected in only four tumours (B16, C26, C51, PO3). Representative photographs are presented in Fig. 3, where MA17/Adr and PO2 did not show detectable levels of E-selectin. In B16 melanoma, only few positive cells showed E-selectin expression (Fig. 3), similarly to the C51 colon adenocarcinoma and the PO3 pancreatic adenocarcinoma which also showed some isolated vessels expressing E-selectin. The C26 colon carcinoma expressed E-selectin to a high degree (5-15%), with numerous vessels expressing this selectin, although with a heterogeneous distribution, as depicted in **Fig. 3**.

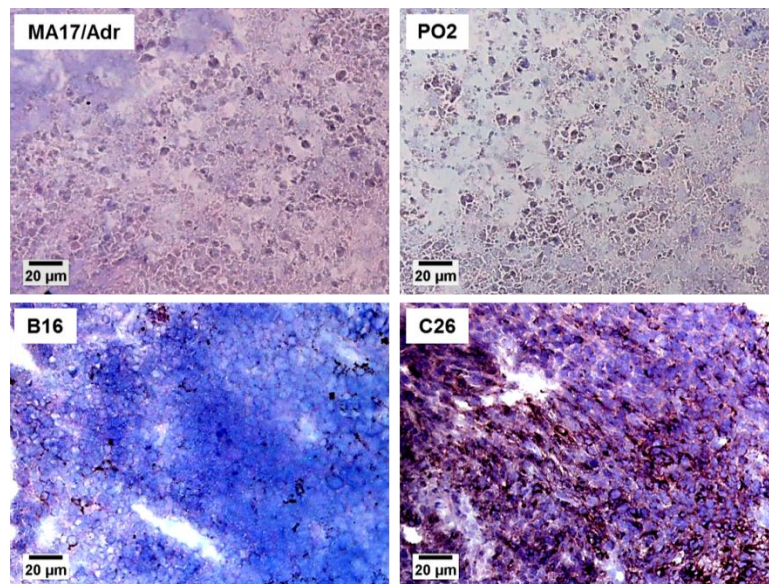


Figure 3. E-selectin expression in representative mouse tumours.

MA17/Adr mammary adenocarcinoma and PO2 pancreatic adenocarcinoma representing undetectable expression; B16 melanoma, poor expression (<5%); C26 colon carcinoma, high expression (5-15%). Mouse tumour slices of 10 µm were stained using CD62E antibody, as described in Materials and Methods. Original magnification $\times 100$, bar 20 µm.

3.6 Co-expression of integrin $\alpha\beta 3$ and E-selectin in tumours

To study the localization of $\alpha\beta 3$ and E-selectin in the two tumours that co-expressed these CAMs, i.e., B16 and C26, we used adjacent histological sections presented in Fig. 4. The co-expression of $\alpha\beta 3$ and E-selectin was not homogeneously distributed and was only observed at the tumour periphery for B16 and C26 tumours. In addition, we noted that the detection of PECAM-1 expression exhibited a denser vascularization in these areas.

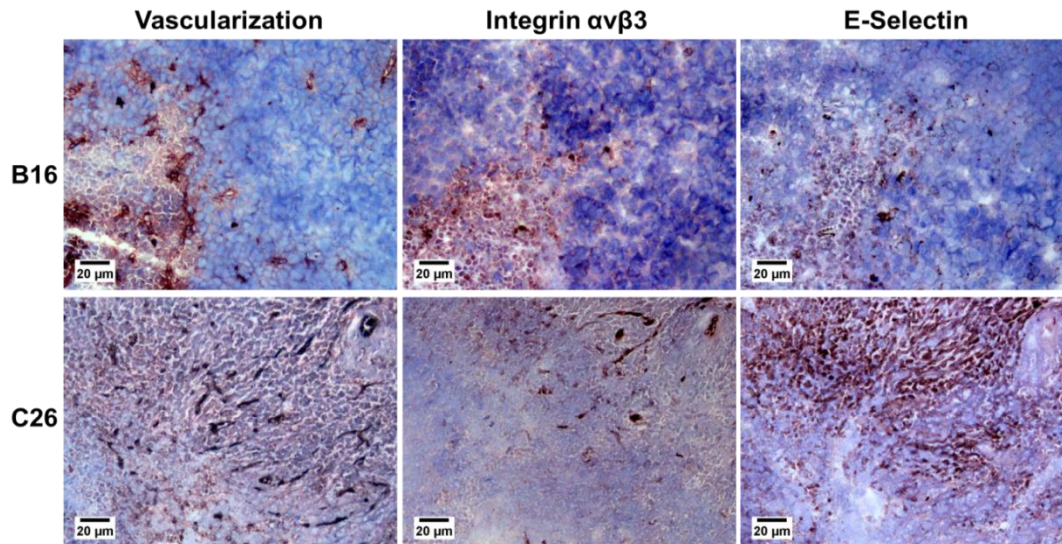


Figure 4. Co-expression of $\alpha v\beta 3$ integrin and E-selectin in colon carcinoma C26 and B16 melanoma.

Adjacent slices showing the vascularization (PECAM-1, CD31), the integrin $\alpha v\beta 3$ (CD61) expression and the E-selectin (CD62E) expression in B16 melanoma and C26 colon tumour. Adjacent slices were processed with the different antibodies as described in Materials and Methods. Original magnification $\times 100$, bar 20 μm .

4. Discussion

The aim of this study was to better characterize the vascular density and the CAMs expression in murine solid tumours frequently employed in preclinical research. These data could facilitate the choice of the best tumour models for testing therapeutic approaches aiming at blocking angiogenesis or destroying existing tumour vascularization.

Concerning the vascular density, assessed with the staining of a CAM constitutively expressed by endothelial cells (PECAM-1, CD31), we found significant differences between the various tumours examined. Indeed, the least vascularized tumour was the B16 melanoma, whereas the colon and mammary tumours were all well vascularized. Also of note, the pancreatic tumours, the sarcoma (GOS) and the lung (LLC) tumours were found to be the most vascularized tumours in our series. There was apparently no correlation between the vascular density and the metastatic potential, because some poorly vascularized tumours are known to be highly metastatic (e.g., B16; compare Tables 1 and 2), whereas other tumours were highly vascularized and are moderately metastatic (e.g., GOS). Although these results may appear to contradict observations showing that high vascularization often correlates with metastatic potential within the same tumour type (reviewed in [30]), it should be noted that in our study, different tumours from various tissue origins were compared,

and not at various growth stages for the same tumour type. Also, the results showing poor vascularization for the B16 melanoma could support the hypothesis that a tumour hypoxic environment could favour metastasis as previously reported [31].

The vascular distribution pattern in tumours was also of interest, because it revealed a well-organized vascularization in all subcutaneously transplanted tumour models. Most tumour types presented a regular and homogeneous distribution of blood vessels (colon, pancreas, sarcoma and lung). However, in the B16 melanoma and the mammary tumours, the blood vessel distribution was found heterogeneous. For the mammary tumours, it was noteworthy that tumours of a same organ origin exhibited a similar vascularization pattern, even if they were transplanted in different mouse strains.

In humans, high tumour vessel density has been shown to be associated with metastasis, tumour progression and decreased survival time in several tumour types, including breast, lung, melanoma, colon, cervix, prostate and bladder [32, 33]. Although increased vascularity could be anticipated to favor oxygenation and drug delivery to tumours, it is possible that the more vascularized tumours metastasize to distant sites and therefore become more difficult to treat because of their dissemination throughout the organism [33].

In this study, we have also assessed the expression of two endothelial CAMs involved in angiogenesis in frequently employed mouse tumour models. These CAMs, including the integrin $\alpha\beta3$ and the E-selectin, are particularly important molecules because they are involved in the process of angiogenesis which is required for tumour growth, cell migration and metastasis [Weis, 2011 10351 /id].

Integrin $\alpha\beta3$ is not constitutively expressed by normal endothelial cells and is therefore considered diagnostic of proliferative endothelial cells in neovascularized areas [9]. In the present study, the $\alpha\beta3$ integrin was expressed in 7/15 of the tumours examined (B16, C26, MA17/Adr, MA25, MA44, PO2, LLC). It is noteworthy that there was no correlation between the tumour type and the expression of this integrin because only 1/3 of colon tumours and 3/7 of mammary tumours expressed this integrin. For the distribution pattern of this integrin in expressing tumours, it was interesting to observe that mammary and lung tumours have a homogenous distribution, whereas C26 and B16 melanoma presented a peripheral distribution. Similar results obtained by magnetic resonance imaging have recently been published for the B16 melanoma where it was also observed that $\alpha\beta3$ is peripherally distributed [34]. Similarly to mouse tumours, the integrin $\alpha\beta3$ has also been found

expressed in the endothelium of several human tumours including melanoma, breast, colon, prostate, cervix, brain, and pancreas, colon, and lung [11, 19, 35, 36].

E-selectin was expressed in only 4 mouse tumours, including B16 melanoma, C26 and C51 colon tumours and pancreatic PO3 tumours. In the C26 colon tumour and B16 melanoma, E-selectin expression was restricted to areas localized at the tumour periphery, which suggests that these areas correspond to tumour neovascularization zones which also expressed the $\alpha v \beta 3$ integrin. This localized expression of E-selectin at tumour periphery has already been observed in previous studies [37, 38]. Like integrin $\alpha v \beta 3$, E-selectin is not expressed by normal endothelial cells but was found on microvessels that showed proliferating endothelial cells [8]. With regard to the E-selectin clinical applications, antagonists have been developed to target cellular interactions with this CAM including antibodies, ligand inhibitors and metabolic carbohydrate mimetics [39]. E-selectin has also recently been used as a target for drug delivery [40].

We noticed that only half of the tumours expressed integrin $\alpha v \beta 3$ and a quarter expressed the E-selectin. Previous studies have also reported heterogeneity in CAMs expression by tumour endothelium, i.e., some tumours are deficient while others highly express CAMs [6]. The deficient CAMs expression could be due to the fact that CAMs are also involved in the inflammatory responses and recruitment processes. A reduced endothelial CAM expression in tumour microvessels could facilitate tumour progression in avoiding the patrolling by circulating lymphocytes [6]. In addition, the heterogeneity of CAMs expression has been shown to depend on tumour type, implantation mode, growth site and host strain [41, 42]. In the present study, subcutaneously implanted tumours have been used and these models may not be the exact reflection of *in situ* tumours, for which more complex interactions between the different CAMs appear to regulate tumour angiogenesis [43].

As previously mentioned, tumour viability, growth and metastasis depend on tumour angiogenesis. Integrin $\alpha v \beta 3$ and E-selectin mediate the processes of microvessel neoformation, and detection of the expression of both CAMs allows to determine whether angiogenesis occurs in a tumour. Indeed, several studies have reported the use of specific angiogenesis specific markers as targeting ligands for systemic drug or gene delivery to cancer [44-46] or to other vascular diseases [47].

The expression of these CAMs in tumours appears to be shared by murine and human tumours as well. For example, $\alpha v \beta 3$ has indeed been found expressed in several human tumours, e.g., melanoma, breast, prostate, cervix, brain and pancreas

[19, 35, 36]. E-selectin has also been identified in human melanoma as a novel target for inhibition of melanoma angiogenesis and tumour growth [53].

These CAMs can be the target of antiangiogenic therapy by using inhibitors of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ [48, 49] or of E-selectin [16]. Indeed, a better knowledge of the CAMs expressed in tumours has already allowed the development of several therapeutic approaches. For example, integrin antagonists, including the $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$ inhibitor cilengitide, have demonstrated encouraging activity in clinical trials [50, 51]. With regard to the E-selectin, antagonists have been developed to target cellular interactions with this CAM including antibodies, ligand inhibitors and metabolic carbohydrate mimetics [39]. E-selectin has also recently been used as a target for drug delivery [40].

In addition to therapeutic applications, the identification of these CAMs in tumours has also permitted the use of this knowledge for molecular imaging. The integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ has been targeted for imaging purposes with near-infrared fluorescent dye-RGD peptide conjugates, their multivalent analogs, and nanoparticle conjugates [50, 52]. E-selectin has also been used as a target for molecular imaging [40].

In conclusion, the assessment of the vascular density and the expression of the important integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ and E-selectin in a series of widely used murine solid tumour models has allowed the identification of several tumours expressing these CAMs. We have also identified two tumours expressing both $\alpha\text{v}\beta 3$ and E-selectin (B16 and C26). These data may prove useful for the choice of appropriate tumour models for the study of the biology of tumour angiogenesis, the evaluation of antiangiogenic therapies and the validation of tumour imaging modalities targeting these CAMs.

Acknowledgments

We are grateful to the Oncology Department of Aventis Pharma, S.A. (now Sanofi, S.A.), for providing the murine tumour samples. This work was supported in part by Gencell S.A., the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Ecole Nationale Supérieure de Chimie Paris (ENSCP). We also thank the Institut National du Cancer for grant support to GGC (INCa, Boulogne Billancourt, France).

References

1. Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-18
2. Nussenbaum F and Herman IM (2010) Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol* 2010:132641
3. Bischoff J (1997) Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 100:S37-S39
4. O. I, Otvos L, Kieber-Emmons T, Blaszczyk-Thurin M (2002) Role of SA-Le(a) and E-selectin in metastasis assessed with peptide antagonist. *Peptides* 23:999-1010
5. Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiha T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M (2002) Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* 25:e30-e35
6. Langley RR, Russell J, Eppihimer MJ, Alexander SJ, Gerritsen M, Specian RD, Granger DN (1999) Quantification of murine endothelial cell adhesion molecules in solid tumors. *Am J Physiol* 277:H1156-H1166
7. Varner JA and Cheresh DA (1996) Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alpha v beta 3. *Important Adv Oncol* :69-87
8. Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, Zurakowski D, Seachord C, Darveau RP, Mulliken JB, Corless CL, Bischoff J (1996) E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol* 148:1181-1191
9. Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA (1996) Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9764-9769
10. Ruoslahti E (2002) Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2:83-90
11. Max R, Gerritsen RR, Nooijen PT, Goodman SL, Sutter A, Keilholz U, Ruiter DJ, De Waal RM (1997) Immunohistochemical analysis of integrin alpha v beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* 71:320-324
12. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164
13. Eliceiri BP and Cheresh DA (1999) The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103:1227-1230
14. Weis SM and Cheresh DA (2011) Alpha v Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006478
15. Haviv YS and Curiel DT (2001) Conditional gene targeting for cancer gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 53:135-154
16. Nguyen M, Eilber FR, Defrees S (1996) Novel synthetic analogs of sialyl Lewis X can inhibit angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 228:716-723
17. Yasuda M, Shimizu S, Ohhinata K, Naito S, Tokuyama S, Mori Y, Kiuchi Y, Yamamoto T (2002) Differential roles of ICAM-1 and E-selectin in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C917-C925
18. Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP (1997) Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol* 151:233-243

19. Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, Birrer S, Luder P, Imhof BA (2001) Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. *Mod Pathol* 14:1126-1132
20. Polin L, Corbett TH, Roberts BJ, Lawson AJ, Leopold III WR, White K, Kushner J, Hazeldine S, Moore R, Rake J, Horwitz JP. (2011) Transplantable syngeneic rodent tumors: Solid tumors of mice. In: Ed. Teicher BA. *Tumors models in cancer research*, Cancer Drug Discovery and Development, New York: Springer Science & Business Media LLC, p. 43-78
21. Fidler IJ (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 35:218-224
22. Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. (1975) Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 35:2434-2439
23. Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. (1977) Evaluation of single agents and combinations of chemotherapeutic agents in mouse colon carcinomas. *Cancer* 40:2660-2680
24. Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. (1978) Biology and therapeutic response of a mouse mammary adenocarcinoma (16/C) and its potential as a model for surgical adjuvant chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 62:1471-1488
25. Schabel FM, Jr., Skipper HE, Trader MW, Laster WR, Jr., Griswold DP, Jr., Corbett TH (1983) Establishment of cross-resistance profiles for new agents. *Cancer Treat Rep* 67:905-922
26. Liang J, Moore RE, Moher ED, Munroe JE, Al-awar RS, Hay DA, Varie DL, Zhang TY, Aikins JA, Martinelli MJ, Shih C, Ray JE, Gibson LL, Vasudevan V, Polin L, White K, Kushner J, Simpson C, Pugh S, Corbett TH (2005) Cryptophycins-309, 249 and other cryptophycin analogs: preclinical efficacy studies with mouse and human tumors. *Invest New Drugs* 23:213-224
27. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, Jr., Schabel FM, Jr. (1984) Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 44:717-726
28. Glasgow LA, Crane JL, Jr., Kern ER, Youngner JS (1978) Antitumor activity of interferon against murine osteogenic sarcoma in vitro and in vivo. *Cancer Treat Rep* 62:1881-1888
29. Bertram JS and Janik P (1980) Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett* 11:63-73
30. Zetter BR (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49:407-424
31. Rofstad EK and Danielsen T (1999) Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 80:1697-1707
32. Strohmeier D (1999) Pathophysiology of tumor angiogenesis and its relevance in renal cell cancer. *Anticancer Res* 19:1557-1561
33. Hasan J, Byers R, Jayson GC (2002) Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 86:1566-1577
34. Boles KS, Schmieder AH, Koch AW, Carano RA, Wu Y, Caruthers SD, Tong RK, Stawicki S, Hu G, Scott MJ, Zhang H, Reynolds BA, Wickline SA, Lanza GM (2010) MR angiogenesis imaging with Robo4- vs. alphaVbeta3-targeted nanoparticles in a B16/F10 mouse melanoma model. *FASEB J* 24:4262-4270
35. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M (2002) Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19:427-436

36. Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prevost N, Tarin D, Shattil SJ, Cheresh DA (2009) An integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 15:1163-1169
37. Nelson H, Ramsey PS, Donohue JH, Wold LE (1994) Cell adhesion molecule expression within the microvasculature of human colorectal malignancies. *Clin Immunol Immunopathol* 72:129-136
38. Fox SB, Turner GD, Gatter KC, Harris AL (1995) The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J Pathol* 177:369-376
39. Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ (2007) Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 11:1473-1491
40. Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G (2012) E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J Control Release* 158:194-206
41. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Koteliansky VE, de Fougerolles AR, Detmar M (2002) The $\alpha(1)\beta(1)$ and $\alpha(2)\beta(1)$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 160:195-204
42. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002) Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking $\beta(3)$ integrin or $\beta(3)$ and $\beta(5)$ integrins. *Nat Med* 8:27-34
43. Tucker GC (2002) Inhibitors of integrins. *Curr Opin Pharmacol* 2:394-402
44. Parkes RJ and Hart SL (2000) Adhesion molecules and gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 44:135-152
45. Wesseling JG, Bosma PJ, Krasnykh V, Kashentseva EA, Blackwell JL, Reynolds PN, Li H, Parameshwar M, Vickers SM, Jaffee EM, Huibregtse K, Curiel DT, Dmitriev I (2001) Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors. *Gene Ther* 8:969-976
46. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresh DA (2002) Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296:2404-2407
47. Spragg DD, Alford DR, Greferath R, Larsen CE, Lee KD, Gurtner GC, Cybulsky MI, Tosi PF, Nicolau C, Gimbrone MA, Jr. (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8795-8800
48. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresh DA (2000) Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha v \beta 3$. *Clin Cancer Res* 6:3056-3061
49. Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B, Presta M, Armstrong L (2001) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ integrin receptor antagonist. *Cancer Res* 61:2232-2238
50. Desgrosellier JS and Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9-22
51. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H (2010) Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* 10:753-768
52. Ye Y and Chen X (2011) Integrin targeting for tumor optical imaging. *Theranostics* 1:102-126

53. Liu ZJ, Tian R, Li Y, An W, Zhuge Y, Livingstone AS, Velazquez OC (2011) Inhibition of tumor angiogenesis and melanoma growth by targeting vascular E-selectin. *Ann Surg* 254:450-456
54. Formelli F, Rossi C, Supino R, Parmiani G (1986) In vivo characterization of a doxorubicin resistant B16 melanoma cell line. *Br J Cancer* 54:223-233
55. Bissery MC, Nguyen CH, Bisagni E, Vrignaud P, Lavelle F (1993) Antitumor activity of intoplicine (RP 60475, NSC 645008), a new benzo-pyrido-indole: evaluation against solid tumors and leukemias in mice. *Invest New Drugs* 11:263-277
56. Bissery MC, Guenard D, Gueritte-Voegelein F, Lavelle F (1991) Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* 51:4845-4852
57. Corbett TH, Leopold WR, Dykes DJ, Roberts BJ, Griswold DP, Jr., Schabel FM, Jr. (1982) Toxicity and anticancer activity of a new triazine antifolate (NSC 127755). *Cancer Res* 42:1707-1715
58. LoRusso PM, Demchik L, Foster B, Knight J, Bissery MC, Polin LM, Leopold WR, III, Corbett TH (1996) Preclinical antitumor activity of CI-994. *Invest New Drugs* 14:349-356
59. DeWys WD (1972) Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors. *Cancer Res* 32:374-379

IV. CHARACTERIZATION OF ECTOPIC AND ORTHOTOPIC COLON CARCINOMA C26 USING NON INVASIVE IMAGING MODALITIES IN MICE

Johanne Seguin^{a,*}, Bich-Thuy Doan^a, Heldmuth Latorre Ossa^b, Arzu Cengizeroglu^c, Manfred Ogris^c, Lauriane Jugé^a, Jean-Luc Gennisson^b, Mickaël Tanter^b, Daniel Scherman^a, Guy G. Chabot^a, Nathalie Mignet^{a,*}

^a Paris Descartes University; Faculty of Pharmacy; Chimie ParisTech; Sorbonne Paris Cité; INSERM U1022; CNRS UMR8151, Chemical, Genetic and Imaging Pharmacology Laboratory; 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. ^b Institut Langevin - Ondes et Images; ESPCI ParisTech; CNRS UMR 7587; INSERM U979; 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. ^c Pharmaceutical Biotechnology, Center for System-based Drug Research, Department of Pharmacy, LMU; Butenandtstraße 5-13, 81377 München, Germany.

Soumis à European Journal of Cancer

Abstract

Background and objectives: The development of new therapies for colorectal cancer is hampered by the lack of models that could easily be assessed using non invasive imaging modalities. In this study, we compared C26 colon carcinoma implanted ectopically or orthotopically in mice by using non invasive imaging techniques, in order to select the most appropriate ones for preclinical testing.

Methods: C26 tumours were implanted subcutaneously (s.c.) in Balb/c mice for the ectopic model, or into the caecum for the orthotopic model. Tumours were evaluated by histology, spectrofluorescence, bioluminescence (BLI), magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasound imaging (US).

Results: Orthotopic tumours grew faster than the ectopic ones. Histology showed homogeneously dispersed cancer cells and blood vessels. The tumour vascular network visualized with labelled albumin showed that both tumour types were highly vascularized and disorganized, although well structured zones were seen in orthotopic tumours. Bioluminescence imaging using C26-luc cells allowed detection of small tumours, but the signal was lost in larger ones. MRI allowed 3D measurement of tumours with high precision and resolution, and provided additional anatomical information. Non invasive US imaging permitted a good delineation of the tumour due to an hypoechogenic signal. The monitoring of tumour growth could be accomplished with US from day 5 after tumour implantation with a short acquisition time (<5 min).

Conclusion: BLI was found to be more appropriate for early tumour detection, whereas MRI and US afforded excellent non invasive imaging techniques to accurately follow tumour growth of both ectopic and orthotopic tumour models.

Keywords: Colon carcinoma, C26, ectopic, orthotopic, histology, bioluminescence imaging, magnetic resonance imaging, ultrasound imaging, luciferase, EGFP cassette.

1. Introduction

Colorectal cancer is the third leading cancer in the world in men and second in women with 1.2 million new cases identified in 2008. In terms of mortality it takes the second place after lung cancer with 608700 deaths in 2008.¹ It is therefore important to develop adapted models that could better reflect the human pathology in order to evaluate diagnostic methods or potential therapies.

Murine colon tumour models can be obtained via in situ generation or via implantation of tumour fragments into appropriate syngeneic or immunosuppressed hosts. In situ models, including chemically-induced, transgenic and spontaneous models, are considered less adapted for the evaluation of experimental therapies because of their inherent variability and the relatively long time required for tumour growth and response to treatment.² Tumour implanted models are still considered as the most appropriate to evaluate the effects of new therapies in colon cancer.³

While ectopic models are frequently employed owing to the ease of their implantation, orthotopic models are considered to better reflect the tumour physiological environment. In particular, significant differences between these models were found mainly in the level of growth factors and nutrients available, and in the profile of tumour angiogenesis and metastasis.⁴ Moreover, orthotopic tumours can metastasize into tissues where they are usually found in spontaneously arising tumours.⁵⁻⁹

In the present study, we have chosen to develop a murine orthotopic colon carcinoma model that would better reflect the clinical colon carcinoma situation, in order to be able to evaluate new anti-angiogenic, anti-vascular and anti-metastatic approaches. To do so, we selected the colon carcinoma 26 (C26) model because we have recently observed that this tumour is well vascularized and express cellular adhesion molecules, e.g., $\alpha\text{v}\beta_3$ and E-selectin, which are important targets for antiangiogenic therapy. In addition C26 is considered as a relatively difficult tumour to treat, as in the human situation.¹⁰

Apart from the surgical issue involved in the orthotopic implantation, the main difficulty of this model depends on the tumour accessibility for accurate evaluation of response to experimental treatment, because calliper measurements cannot be easily carried out. In addition, an overestimation of tumour volume by calliper assessment in orthotopic models has been reported.¹¹ Also, the ethical consideration issue on animal experimentation requires to reduce drastically the number of animals employed in a given experiment.¹²

Considering the above reasons, we therefore turned to non invasive imaging techniques to assess orthotopic C26 tumour growth. In fact, non invasive imaging techniques applied to small animals have improved significantly in the past years. Magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), positron emission tomography (PET), single-photon emission computed tomography (SPECT), ultrasound imaging (US) and bioluminescence imaging (BLI) are now being frequently used and their performance is continuously improving.^{13, 14}

Although these various imaging techniques have been used for *in vivo* studies on small animals,¹³⁻¹⁵ the information available is scarce concerning non invasive growth evaluation of colon tumours growing orthotopically. We therefore chose to evaluate and compare the effectiveness of BLI, MRI and US to better characterize colon carcinoma C26 tumour progression and to obtain quantitative tumour growth parameters. The advantages and limitations of each imaging technique for ectopic and orthotopic models are presented and discussed.

2. Materials and Methods

2.1 Cells

- *Wild type C26 cells (C26-wt).*

The C26-wt cell line was originally obtained from an undifferentiated colon carcinoma chemically induced by *N*-nitroso-*N*-methylurethan,¹⁶ that was later cloned to obtain the stable C26 cell line.¹⁷ This cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2638, LGC Standards, Molsheim, France), and cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Life technologies), 100 µM of streptomycin and 100 U/ml of penicillin.

- *Luciferase transduced C26 cells (C26-luc).*

To obtain a stable luciferase *expressing cell line*, C26-wt cells were transduced with a lentiviral vector encoding for the fusion protein EGFP-Luc cassette under the control of the constitutively active PGK promoter¹⁸ using polybrene. Transduced cells were sorted with a MoFlo cell sorter (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) to obtain a homogeneous cell population of EGFP-positive C26-Luc cells. Pseudotyped lentivirus has been demonstrated to be a powerful tool for stable gene marking of cells.¹⁸ Here, C26-wt were transduced with lentiviral vector based on pHIV7/SF-GFP,

were the EGFP cassette was replaced by the fusion EGFP-Luc under the control of the strong, constitutive PGK promoter. This allows the simultaneous detection of EGFP for sorting purposes and luciferase activity for sensitive BLI. This cell line was cultured as described above for the wild type cell line.

2.2 Animals

Studies were carried out in Balb/c female mice (Janvier, St Genest de Lisle, France), aged 6 to 7 weeks. Animal experiments were conducted according to European and national guidelines and were approved by the institutional ethics committee.

○ *Ectopic tumour implantation*

A mouse bearing a subcutaneous C26 tumour was sacrificed, the tumour was resected, placed into DMEM culture medium and cut into fragments of 20-30 mm³. The tumour fragments were transferred into sterile phosphate buffer saline and inserted s.c. using 12 gauge trochar (38 mm) into the mouse flank previously disinfected with alcohol. For the C26-wt line, tumours were implanted every two weeks. In these conditions, the take rate was 100%. For BLI experiments, C26-luc luciferase positive cells (10⁶ cells /mL DMEM, 100 µL) were injected s.c. into both flanks of the mice. Before tumour implantation, cells were tested for luciferase activity.

○ *Orthotopic tumour implantation*

Allografts were prepared from ectopic tumours passaged as described above. Tumours were implanted orthotopically as described by Tseng et al.¹⁹ Briefly, mice were anesthetized and their abdomen was shaved and disinfected with Betadine (Meda Pharma, France). A laparotomy was conducted in order to access to the abdominal cavity. The tumour fragment was sutured onto the caecum and finally the muscular tissue and the skin were stitched.

2.3 Ex vivo characterization

In order to evaluate histology and tumour weight evolution of both models, five mice per model and per time point were implanted. At the indicated time points (5, 10, 15 or 21 days), mice were sacrificed and their tumours resected. A photograph of

each tumour was captured using a Canon Digital IXUS 80 IS camera. Finally, the tumour was weighed and flash frozen in liquid nitrogen.

2.4 Immunohistochemistry

Ten-micron frozen tissue sections were placed on Polysine slides (Polysine®, CML, Nemours, France). Immunostaining for the evaluation of the vascularity was performed using a three-step procedure as previously described.²⁰. Briefly, the tissue sections were first incubated with a rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody (BD Biosciences, le Pont de Claix, France; 15.6 µg/ml) for 2 H at 37°C. The sections were next incubated for 30 min with goat anti-rat biotinylated antibody (0.5 mg/ml) and finally with the streptavidin-conjugated peroxidase (Sigma, 1/400 dilution). The staining was carried out with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) substrate to obtain a brown precipitate. Tissues were counterstained with Gill's haematoxylin to visualize cell nuclei.

2.5 3D vasculature visualization by fluorescence imaging

Mice were anaesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (80 and 10 mg/kg, respectively) and a solution of albumine-alexa fluor 594 (Molecular probes, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) was injected intravenously (i.v.) into the tail vein (0.5 mg/mL, 100 µL per mouse). A subcutis incision near the tumour for the ectopic model and a laparotomy for orthotopic model were realized in order to visualize the tumour vascularization under a Leica fluoromicroscope (Z6 APO), and the image acquisition was performed with a Leica camera (DFC 340Fx).

2.6 Bioluminescence imaging

Mice were anaesthetized with isoflurane. Luciferin diluted in PBS (Promega, Madison WI, USA) was injected intraperitoneally (i.p. 2 mg/mouse). Optical imaging was performed with a cooled CCD camera (Photon Imager, Biospace Lab, France). Luminescence was acquired during 1200 s and initiated immediately after the luciferin injection. The luminescence levels were integrated within the hand drawn region of interest (ROI) around the luminescence zones corresponding to the tumour area.

2.7 In vivo calliper measurement

Bidimensional measurement of tumour growth was carried out using a calliper and the tumour volume (in mm³) was calculated using the following formula: $V = 1/2 \times L \times W^2$, where L is the length and W the width of the tumour in mm.²¹

2.8 Volume and density assessment

The tumour density of C26 allograft were determined by using the tumour mass in g obtained with a digital balance and the tumour volume in mm³ obtained by *ex vivo* calliper measurement of the three dimensions of the tumour burden : the height H, the length L and the width W with the formula $(\pi/3) \times L \times W \times H$.

2.9 Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The MRI studies were performed using a MRI spectrometer 7T PharmaScan (Bruker, France, ESPCI Imaging Platform) dedicated to small animal experimentation. Images were recorded using a 36 mm inner diameter birdcage Bruker RF probe. Mice were anaesthetized using 1.5% isoflurane gas with a mixture of air/O₂ (1 L/min : 0.5 L/min). Physiological parameters of temperature and breathing rates were controlled. In order to delineate 3D volumes, Gradient Echo imaging sequence was used. Thirty slices of 0.83 mm thickness with a plane resolution of 0.208 mm were acquired during 3 min. T2 weighting Spin Echo images were realized into five axial slices localized in the tumour centre. These slices have a thickness of 0.6 µm, a plane resolution of 0.120 mm and an echo time TE of 54 ms. T2 quantification was performed with multi Echo SE sequence using the formula $S(TE) = S_0 e^{-TE/T_2}$. For the calculation of the hyposignal area a threshold of 8% was applied in the images from T2* weighted images. The percentage of hyposignal area was obtained by the mean of the number of pixels under the threshold per slice divided by the slice area.

2.10 Ultrasound (US) imaging

Ultrasound imaging was performed using an ultrafast ultrasound device (Aixplorer, Supersonic Imagine, Aix en Provence, France) coupled with a high-frequency ultrasound probe (central frequency 15 MHz, 256 elements, Vermon, Tours, France). Mouse anaesthesia was performed using isoflurane, in the same conditions as described above for MRI imaging. By using classical ultrasound imaging, so-called B-mode, the operator localized the tumour within the imaging

plane in real time by placing the probe on the anaesthetized mouse. Once the probe was positioned, B-mode acquisitions were performed to obtain a morphological image of the tumour in two perpendicular imaging planes (axial and sagittal) in order to measure their largest diameters. Thus, three diameters (two in the axial and one in the sagittal planes) were recorded, giving access to volume quantification according to the following spheroid formula $(\pi/3) \times L \times W \times H$, where H is the height, L is the length and W is the width in cm¹¹.

2.11 Immunostaining quantitative analysis

For the characterization of the tumour vascularization, we developed a method for the quantification of various markers using the imageJ software.²² The images were first segmented to isolate the positive structure of interest and the images were then transformed into binary ones. Finally, the edges of the stained cells were selected and the various parameters, such as counts and areas, were determined.

2.12 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software, using the Mann-Whitney U test, in which gaussian distribution is not assumed. The Spearman test was applied to evaluate the correlation between two measurements.

3. Results

3.1 Ex-vivo characterization of ectopic and orthotopic carcinoma mouse models

We first characterized the ectopic and orthotopic colon carcinoma C26 models using invasive methods. To do so, tumours were resected and weighed at different times. **Figure 1A** depicts the C26 tumour weight evolution for the ectopic and the orthotopic implantation during 21 days. The orthotopic tumours grew significantly faster than the ectopic ones. Representative tumour photographs taken on day 15 are shown in **Figure 1B** for the ectopic, and in **Figure 1C** for the orthotopic implantation.

We also evaluated the tumour density on day 15 after tumour implantation for both models. The tumour density was found to be $1.53 \pm 0.32 \text{ g/cm}^3$ and $1.77 \pm 0.26 \text{ g/cm}^3$ for ectopic and orthotopic models, respectively, which was not statistically

different. However, these density data can be useful to translate into actual tumour weight the volume data obtained by the various imaging techniques described below.

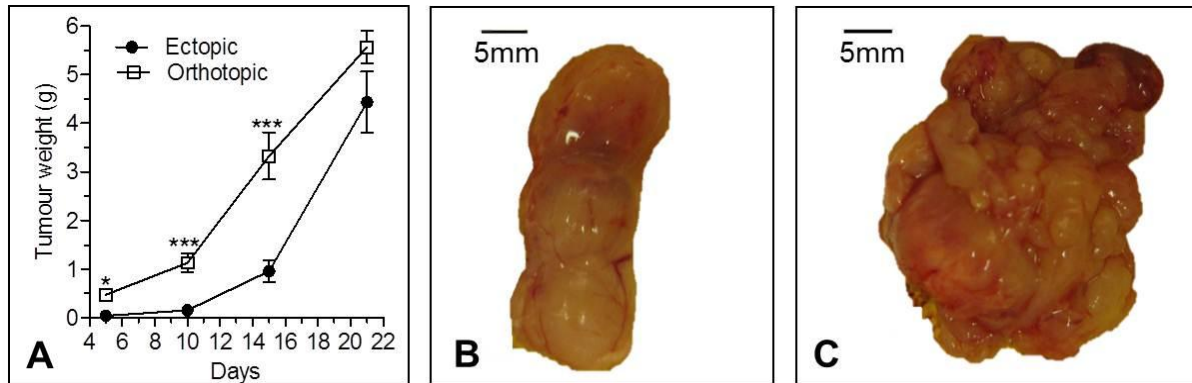


Figure 1: Ex-vivo characterization of ectopic and orthotopic colon carcinoma C26 implanted in mice.

(A) Tumours were harvested from Balb/c mice at the indicated days and weighed. The means $\pm$ SEM of 5 tumours are presented. The asterisks indicate a significant difference between the orthotopic (squares) and the ectopic group (circles) using the Mann Whitney test. Photographs of a representative tumour on day 15 is shown in (B) for the ectopic implantation, and in (C) for the orthotopic tumour (scale bar, 5 mm).

3.2 Histological characterization of cellularity and vessel density

To quantify cellularity and vessel density of the colon tumours at different times, we next performed histological analyses by staining the tumour tissue with PECAM-1 and haematoxylin. As depicted in **Figures 2A** and **2B**, the sections were relatively similar in both implantation sites, with homogenously dispersed cancer cells and vessels.

Quantitative analyses of the histological sections allowed determining the microvascular density (MVD) and cellularity of the tumours. **Figure 2C** presents a comparison of the MVD for both models. For the ectopic model, the MVD was found relatively stable during 21 days ranging from of 800 to 1100 vessels/mm². However, for the orthotopic model, the C26 tumours presented a significantly lower MVD level in the early days after tumour implantation compared to the ectopic ones (476 ± 50 vessels/mm² on day 5), but increased rapidly thereafter to reach the ectopic MVD values on day 11 (968 ± 36 vessels/mm²). Beyond day 11, the MVD of orthotopically implanted tumours remained relatively stable and was similar to the subcutaneous model.

Cellularity presented in Figure 2D decreased significantly for both models between the 5th and the 11th day. Cellularity values decreased from $14.7 \pm 1.0 \times 10^3$ to $13.6 \pm 0.5 \times 10^3$ cells/mm² for the ectopic model and from $18.0 \pm 1.3 \times 10^3$ to $12.6 \pm 1.0 \times 10^3$ cells/mm² for the orthotopic model, respectively. After the 11th day until

the 18th day the cellularity remained stable for both models. A significant increase in cellularity was however observed for both tumour implantation sites after day 18.

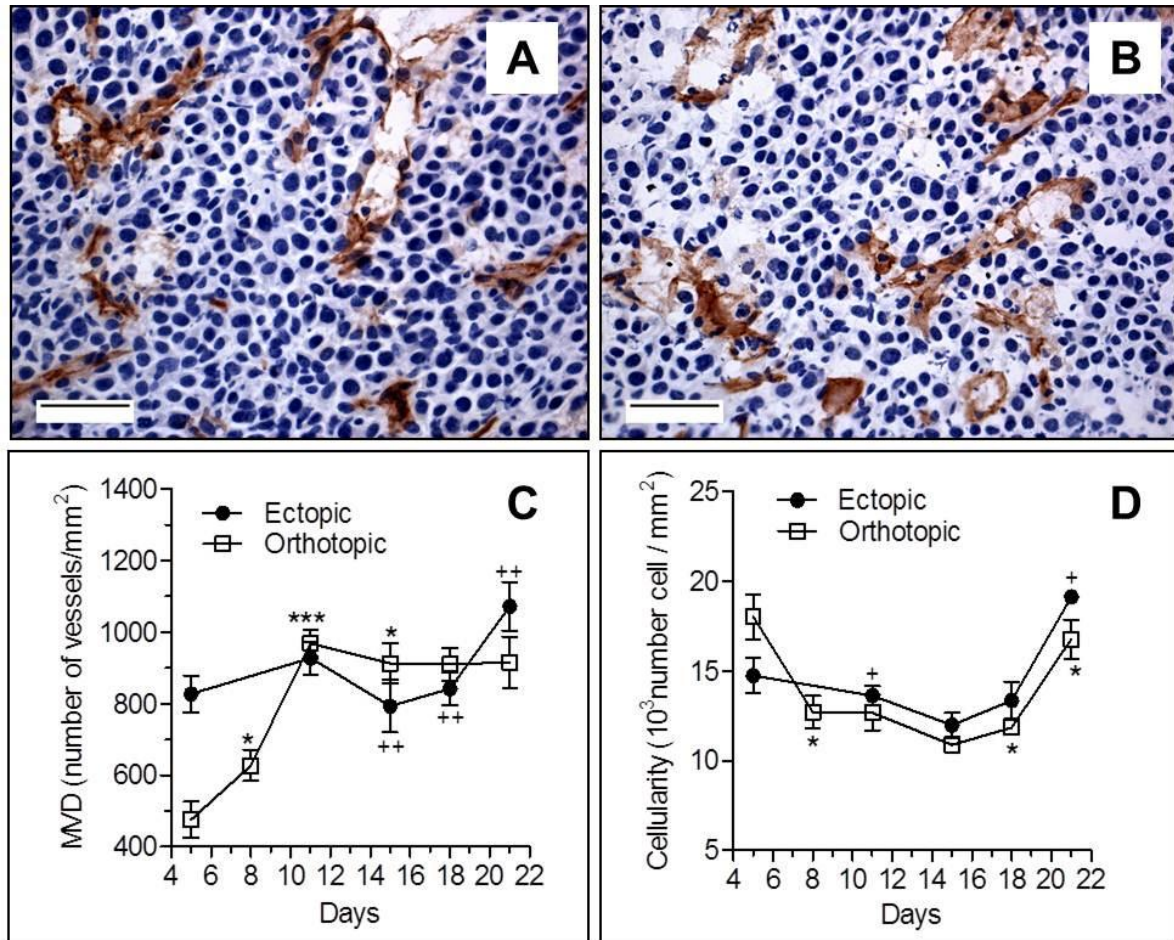


Figure 2: Histological characterization of cellularity and vessel density of C26 tumours.

Histological images obtained after immunohistochemistry of PECAM 1 (positive staining in brown) and haematoxylin counterstain for ectopic (A) and orthotopic (B) 15 days after tumour implantation (original magnification 400 x, scale bar 50 μ m). Microvascular density (MVD) quantification (C) and cellularity (D) are presented as a function of time (mean $\pm$ SEM).

3.3 3D vascular organization of ectopic and orthotopic tumours

Because the above data were mainly concerned with two-dimensional comparison between the evolution of tumours implanted in two different sites, we were next interested to investigate if the implantation strategies could have an effect on the vascular organization using a 3D evaluation method.

Figure 3 presents the vascular network of C26 colorectal tumours obtained after the i.v. injection of labelled albumin. It can be observed that ectopically implanted tumours were highly vascularized and presented vessel disorganization with several shunts (**Fig. 3A**). For the orthotopic model shown in **Fig. 3B**, in addition to similar vessel disorganization observed for the ectopic tumour, we noted several well structured and parallel vessel zones as illustrated in **Fig. 3C**.

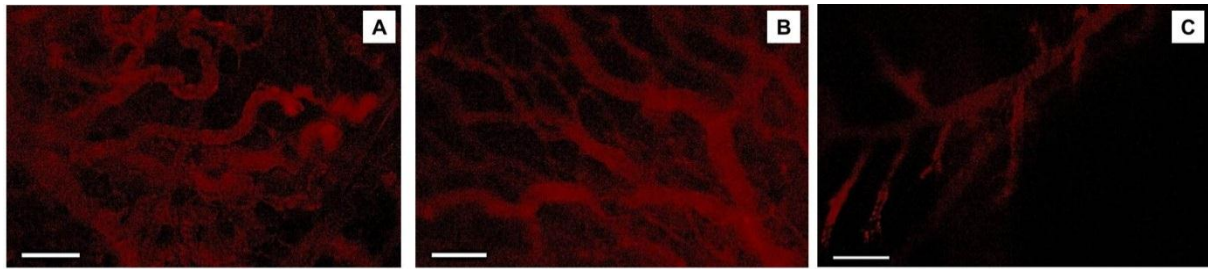


Figure 3: 3D vascular organization of ectopic and orthotopic C26 tumours.

The 3D vascular organization was investigated by fluorescence using rhodamine-labeled albumin injected i.v. (A) Ectopic. (B) Orthotopic. (C), Detail of a representative well structured zone from an orthotopic tumour. Scale bar, 100 μ m.

3.4 Bioluminescence imaging (BLI) for assessment of the ectopic model

Because the above invasive evaluation methods of tumour evolution required the sacrifice of the mice, we next explored the characterization of colon carcinoma C26 models by using a bioluminescence imaging as a non invasive method. BLI has been proved to be highly sensitive and easy to perform for the assessment of tumour evolution.^{23, 24, 25} For this technique we used luciferase transduced C26 (C26-luc) cells which allowed the detection of luminescence after i.p. injection of luciferin. These cells were prepared as described in the We first verified the bioluminescence stability of C26-luc cells as a function of cell passages. It was observed that the bioluminescence level declined from $2.15 \pm 0.07 \times 10^6$ counts per second on day 1 to $1.12 \pm 0.04 \times 10^6$ counts per second on day 66 (passage 35), which remained a remarkably high level. Nevertheless, *in vivo* injection of 10^5 cells (before passage 10) exhibited 10^6 counts per second which was easily detectable.

C26-luc cells were injected s.c. and tumour evolution was followed for 13 days as illustrated in **Figure 4A**. Four days after cell injection, bioluminescence signal could easily be detected. This signal increased until day 8 and decreased thereafter on days 11 and 13 as illustrated in Fig. 4A and quantified in **Fig. 4B**.

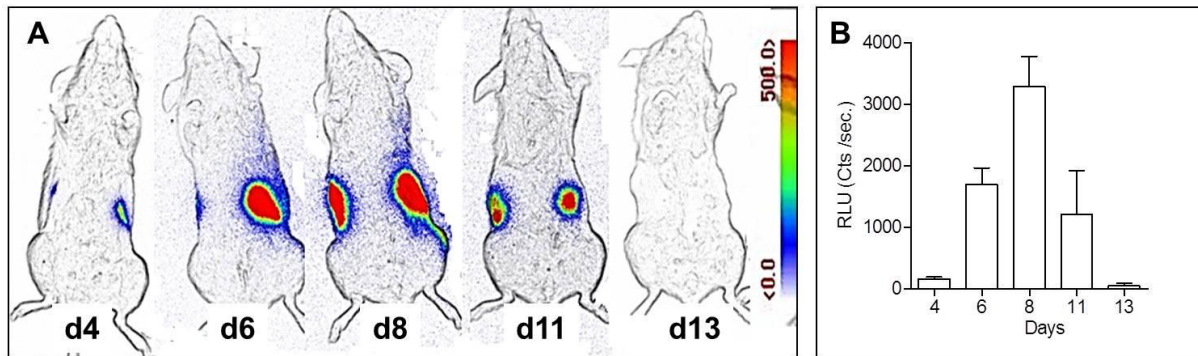


Figure 4: Bioluminescence evaluation of tumour growth in the C26-luc ectopic model.

Mice bearing bilateral implantation of C26-luc tumours were injected with luciferin i.v., and the bioluminescence signal was recorded as described in Materials and Methods. Evaluation of tumour progression by bioluminescence imaging for the ectopic model. A, representative images from days 4, 6, 8, 11 and 13. B, histograms showing the quantification in counts per second. Mean $\pm$ SEM of 6 determinations.

Figure 5A shows that the decrease in luminescence signal beyond day 11 was accompanied by a slower tumour growth from C26-luc cells as compared to C26-wt cells. Figure 5B shows that in the early time points, tumour volume was significantly correlated to BLI signal ($r = 0.6553$, between day 4 to 8), but this correlation became insignificant if points beyond day 8 were included in the analysis (data not shown).

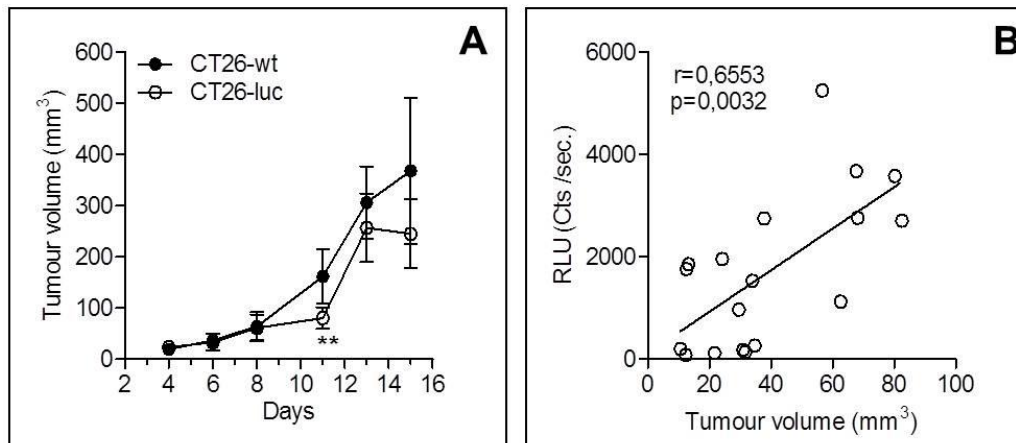


Figure 5: Evaluation of bioluminescence for assessment of colon carcinoma C26 tumour growth.

(A) Comparison of tumour volume evolution as a function of time for ectopic C26-wt (solid circle) and C26-luc (open circle) after external calliper measurements. (B) Correlation curve between BLI (in counts per second) and tumour volumes (estimated with a calliper).

3.5 Longitudinal growth monitoring of C26 tumours by MRI

We next explored the characterization of colon carcinoma C26 models using MRI. **Fig. 6A** depicts a representative coronal image obtained from T2* weighted sequences in which axial slices (white lines) were positioned in the tumour area (white arrow). In these axial slices, tumour burden was easily detected without the

use of a contrast agent. The tumour mass appeared in grey and the outline was relatively well defined as shown in **Fig. 6B-C** (white arrows). From these images, it was possible to calculate the tumour area by addition of the surfaces of the consecutive axial slices positioned in the tumour mass and the tumour volume taking into account the number of slices involved.

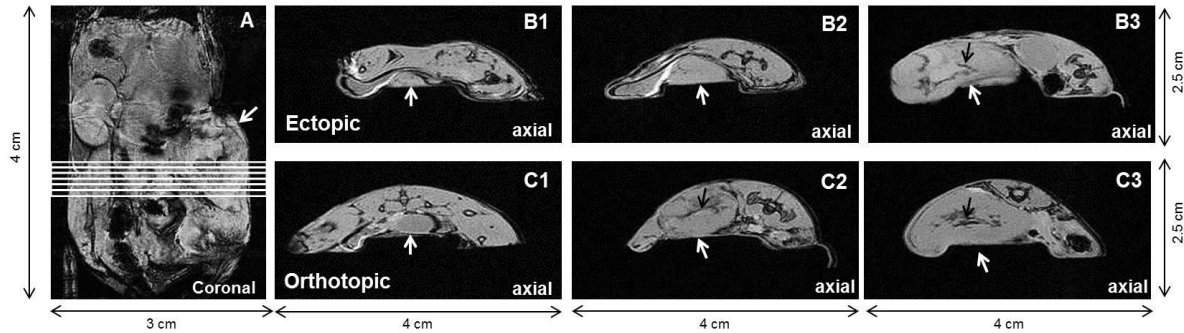


Figure 6: T2* weighted images showing the ectopic and orthotopic C26 tumour.

(A) Example of coronal image of ectopic model at day 15. T2* weighted imaging provide anatomical axial images of ectopic (B) and orthotopic model (C) at day 5, 11 and 15.

Figure 7A presents tumour measurement with MRI, ranging from small tumours, of 15 to 20 mm³ on day 5, but also large tumours up to 3000-3400 mm³ on day 18. Tumour growth increased for both ectopic and orthotopic tumours and followed a similar profile, although significant differences were observed between the two implantation sites on day 11 and day 15, where the orthotopic tumours were growing faster than the ectopic ones.

Additional information can be obtained from the T2* weighted images. The fraction of hyposignal (Fig.6 B3, C2 and C3, black arrows) in the tumour mass could be measured and is presented as percentage in Figure 7B. Late stage tumours (day 11 to day 18) presented a sharp increase in the hyposignal area in the ectopic model ($6.6 \pm 0.8\%$ to $22.5 \pm 2.9\%$), whereas it remained relatively stable in the orthotopic one ($14.0 \pm 3.6\%$ to $12.7 \pm 2.7\%$).

T2 weighted images provide valuable information about extracellular water such as oedemas.^{26, 27} For ectopic model, T2 decreases significantly ($p < 0.05$) from day 5 (56.4 ± 3.0 ms) to day 11 (46.1 ± 1.5 ms) and remains stable beyond this time point (48.5 ± 1.0 and 47.5 ± 1.5 ms for day 15 and 18 respectively). For orthotopic model a similar profile was observed (data not shown). These data suggest that both tumour implantation sites do not induce oedema, because no hypersignal area was detected.^{26, 27}

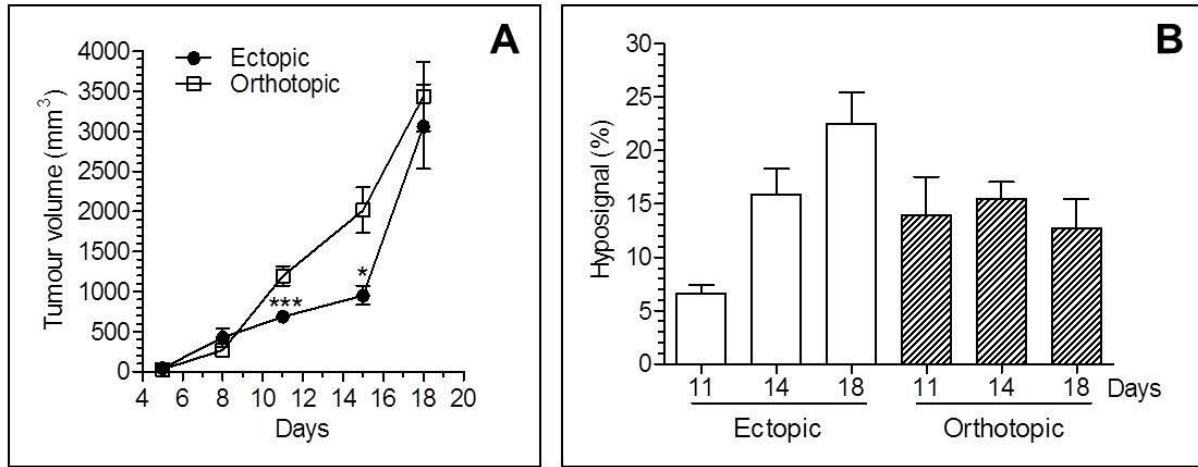


Figure 7: Quantification of volume and necrosis in T2* weighted images for each tumour type. Evaluation of tumour volume with images quantification for ectopic and orthotopic model as a function of time (A). Evaluation of necrotic area as a function of time for both models (B).

3.6 Longitudinal growth monitoring of C26 tumours by Ultrasound (US) imaging

We also evaluated the non invasive US imaging technique in order to assess its usefulness for the monitoring of colon C26 growth. As presented in Fig. 8, the B-mode images showed a contrast difference due to an hyperechogenicity of the skin and an hypoechogenicity of the tumour. The resulting contrast enhancement allowed to delineate the tumour margins and measure the tumour height, length and width, which allowed to calculate the tumour volumes. Examples of such measurements on a representative ectopic tumour on day 15 are presented in Fig. 8 depicting two perpendicular views (A and B). These images allowed to quickly measure the three dimensions necessary to assess the tumour volume as stated in Materials and Methods.

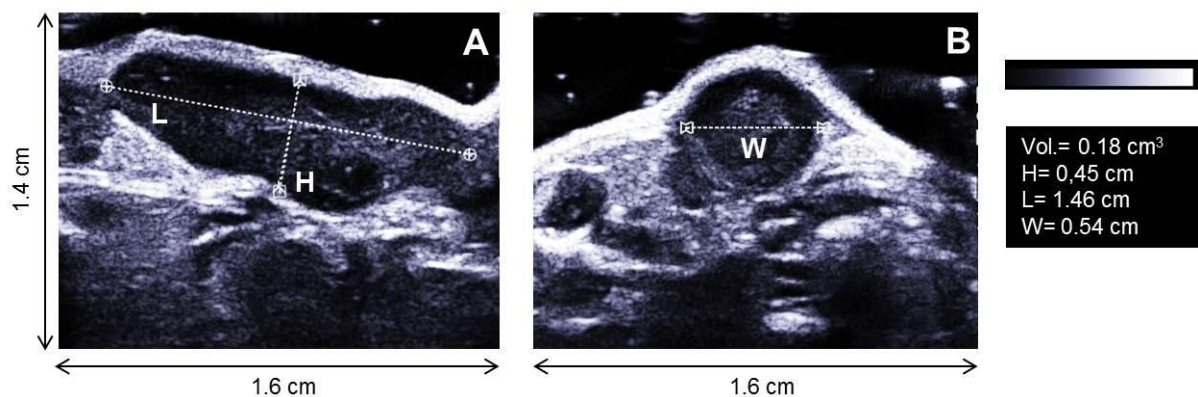


Figure 8: Method used for the calculation of tumour volume by ultrasound imaging. Images show an example from an ectopic tumour on day 15 using a sagittal (A) and an axial (B) view.

Figure 9 depicts representative tumour images from both implantation sites on days 5, 12 and 15. Using US, tumour measurement could be obtained as early as 5 days after tumour implantation for both models, and allowed an easy non invasive monitoring of tumour growth. US imaging allowed the measurement of small tumours on day 5 of $15.8 \pm 2.1 \text{ mm}^3$ for the ectopic site (Fig. 9A1) and $31.9 \pm 4.0 \text{ mm}^3$ for the orthotopic one (Fig. 9B1). On day 15, the tumour volume values reached $519.7 \pm 56.6 \text{ mm}^3$ (Fig. 9A3) and $1101.0 \pm 117.0 \text{ mm}^3$ (Fig. 9 B3) for the ectopic and orthotopic models, respectively. These data presented in Fig. 9C showed that the orthotopic tumours were growing significantly faster than the ectopic ones.

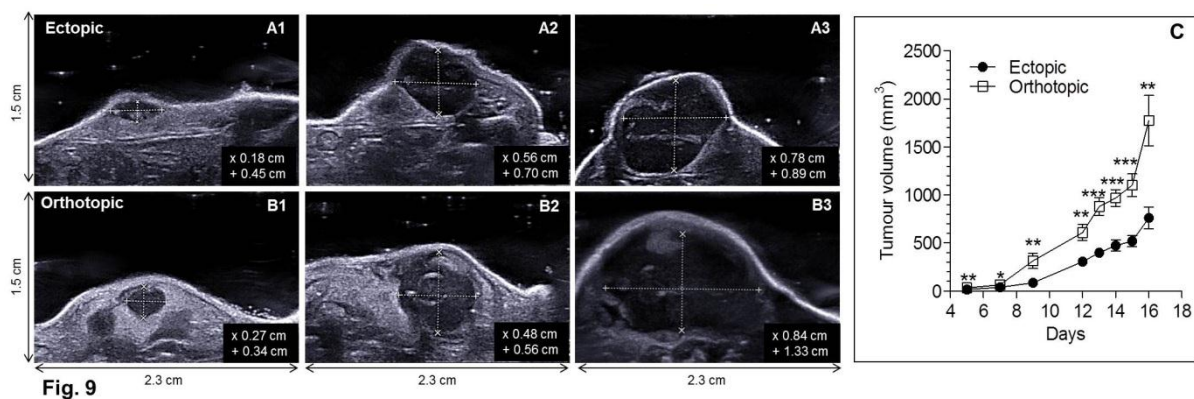


Figure 9 : Ultrasound longitudinal monitoring of tumour volume.

Representative images used for the quantification of tumour volume for ectopic (n=13) on day 5 (A1), 12 (A2) and 15 (A3), and orthotopic (n=13) on day 5 (B1), 12 (B2) and 15 (B3).

4. Discussion

In this study we have evaluated different non invasive imaging modalities which could allow to obtain more precise informations on orthotopic C26 colon carcinoma growth. Even though, the orthotopic model has previously been described,^{28, 29} the simultaneous evaluation of methods including histology, spectroscopy, BLI, MRI and US has not been reported. We therefore compared these non invasive imaging modalities which could be advantageously applied in the follow-up of preclinical experimental therapies aimed at finding better treatments for human colorectal cancer.

We first compared *ex vivo* the ectopic and orthotopic C26 models and observed a significant difference in tumour growth, which was faster for the orthotopic compared to the ectopic tumours. This faster growth has previously been described for human colon tumours implanted in nude mice⁹ and for C26 tumours.²⁸ Although there is some information on the growth rate in the literature,¹⁷ very few attempts have been devoted to the precise characterization of these tumours.²⁸

Our results have shown that C26 tumours display tumour density values in the range of 1.5-1.8 g/cm³, a value often underestimated by most authors, which often assume a density equals to 1 g/cm³.²¹ It is important to consider that density values may vary depending on tumour type, site of implantation and tumour volume. These variations in density values are probably due to changes in cellularity, in hypoxic or necrotic areas and vascular volume.

Examination of the histological results showed that the MVD value was significantly lower for the orthotopic model in the early time points as compared to the ectopic implantation. These data may indicate that the implanted C26 tumour fragments from s.c. tumours probably needed time to adapt to their new normal caecal microenvironment. These values are of importance considering that the angiogenic phase of orthotopic model requires more time to develop, as compared to the ectopic model, which indicates that the orthotopic implantation would be a more appropriate model for evaluating antiangiogenic experimental therapy. With regard to anti-vascular approaches, both models appear appropriate after day 11, where the MVD was almost equivalent.

The effect of these antitumour approaches on vessels could be followed using 3D fluorescence imaging with labelled albumin. Indeed, we showed for the first time here that this imaging technique allowed observing the vascularisation in both ectopic and orthotopic tumour models. However, it should be noted that vessel imaging using

labelled albumin only allows to visualize the superficial vascular system and that quantification still needs to be addressed.

Bioluminescence data have shown that ectopic tumours could be detected and measured as early as day 4. This technique has indeed been widely used for orthotopic tumour assessment because it is highly sensitive and allows early detection,^{24, 30} although hypoxic conditions and light absorption can impair detection in deep tissues. However, in superficial tissues, *in vitro* and *in vivo* bioluminescence measurements strictly correlate.³¹ In our experiments we used C26 cells stably marked with lentivirus harbouring an expression cassette with the strong constitutive PKG promoter and the fusion gene EGFP-Luc. This fusion usually gives a strong BLI signal *in vivo* when compared to the luciferase gene alone. However beyond day 8, the BLI signal from EGFP-Luc marked C26 cells were surprisingly decreased, which was also accompanied by reduced tumour growth compared to C26-wt cells. This is in contrast with the findings of Hiraoka et al.³² who reported continuous tumour growth and increase in BLI signal for at least 28 days, indicating that tumours were accessed by the substrate luciferin and that no immunological clearance occurred. In our case, no anti-luciferase antibodies could be evidenced in the serum of mice bearing ectopic C26-luc tumours. Another potential immunogene could be EGFP cassette present in the lentivirus EGFP-Luc expression cassette. However, it has been previously shown that luc and EGFP, used in syngeneic C57/BL6 tumour models, did not induce detectable immunological reactions against the transgene and provided a good correlation between tumour size and reporter gene signal.³³ However, in contrast to other strains, the Balb/c strain used in our study already bears an intrinsic T-cell mediated immune response for GFP,³⁴ which could probably be involved in the high clearance of a considerable part of EGFP-Luc expressing tumour cells. For these reasons, BLI with our C26-luc cells appears not suitable for the follow-up of tumours beyond day 8, but could still be advantageously applied in the early growth stages.

MRI provided highly resolved anatomical images and enabled to monitor the tumour growth of both C26 models from early stage (day 5) to late growth stage (day 21). In addition, it could allow the precise determination of 3D tumour volume in both models. Moreover, with this imaging modality it was possible to calculate a percentage of hyposignal area which could mainly correspond to haemorrhagic necrotic area. {Van Bruggen N., 1990 186 /id} This information could be particularly important with regard to prediction of response to experimental therapy. Despite its

many advantages, MRI remains an expensive and relatively time consuming modality, which requires anaesthesia and 15 to 20 min acquisition time per mouse.

Ultrasound imaging data provided a good estimation of tumour volume in both implantation models. US imaging has also been previously shown to yield more accurate data, as compared to calliper measurements,¹¹ because errors in the range of 27% are frequently observed with the manual measurements and estimation values may also vary between operators.³⁶ Moreover, US imaging was found to be easy to perform and required only 1 to 5 min per mouse.

5. Conclusions

In summary, C26 ectopic and orthotopic tumours were compared and characterized using histology and non invasive BLI, MRI and US imaging techniques. Tumour growth was shown to be faster in orthotopic model compared to the ectopic one. Vascular density was smaller for early stage orthotopic tumours compared to the ectopic tumours. Cellularity decreased for both models until day 15 and increased thereafter. BLI could be used for early monitoring of ectopic tumours but not for late stage tumours. MRI and US non invasive imaging techniques were shown to be particularly suitable for the accurate follow-up of C26 colon carcinoma growth in both orthotopic and ectopic models.

Acknowledgements

Dr Martina Anton (Technical University, Munich) is gratefully acknowledged for providing EGFP-Luc lentivirus, and Dr Joachim W Ellwart (Helmholtz Center, Munich) for the sorting of C26-EGFPLuc cells. We thank René Lai Kuen and Bruno Saubamea of the IMTCE-Cellular & Molecular Imaging Central Facility of the Faculty of Pharmacy-Paris Descartes University. F Sandoval, E Tartour and E. Marcheteau (Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Immunologie Biologique, Paris) for helpful discussions on antibodies search.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
2. McConville P, Elliott WL, Kreger A, et al. Preclinical Models of Tumor Growth and Response. In Shields AF, Price P, eds. *Cancer Drug Discovery and Development-In Vivo Imaging of Cancer Therapy*. Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 2007, 13-32.
3. Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med* 2000;50:16-26.
4. Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005;22:16-25.
5. Kashtan H, Rabau M, Mullen JB, et al. Intra-rectal injection of tumour cells: a novel animal model of rectal cancer. *Surg Oncol* 1992;1:251-256.
6. Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K, Fidler IJ. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. *Cancer Res* 1986;46:1928-1933.
7. Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 1994;56:4-8.
8. Bresalier RS, Hujanen ES, Raper SE, et al. An animal model for colon cancer metastasis: establishment and characterization of murine cell lines with enhanced liver-metastasizing ability. *Cancer Res* 1987;47:1398-1406.
9. Pocard M, Tsukui H, Salmon RJ, Dutrillaux B, Poupon MF. Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In Vivo* 1996;10:463-469.
10. Polin L, Corbett TH, Roberts BJ, et al. Transplantable syngeneic rodent tumors: Solid tumors of mice. In Teicher BA, ed. *Tumors models in cancer research, Cancer Drugs Discovery and Development*. Second ed. New York, Springer Science & Business Media LLC, 2011, 43-78.
11. Cheung AM, Brown AS, Hastie LA, et al. Three-dimensional ultrasound biomicroscopy for xenograft growth analysis. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:865-870.
12. Workman P, Balmain A, Hickman JA, et al. UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Lab Anim* 1988;22:195-201.
13. Lyons SK. Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *J Pathol* 2005;205:194-205.
14. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell Oncol* 2006;28:127-139.
15. Soling A, Rainov NG. Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:1163-1172.
16. Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975;35:2434-2439.
17. Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarraf AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 1980;40:2142-2146.
18. Yam PY, Li S, Wu J, Hu J, Zaia JA, Yee JK. Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2002;5:479-484.

19. Tseng W, Leong X, Engleman E. Orthotopic mouse model of colorectal cancer. *J Vis Exp* 2007;484.
20. Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, et al. E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol* 1996;148:1181-1191.
21. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24:148-154.
22. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004;11:36-42.
23. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:733-744.
24. Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2000;2:491-495.
25. Zeamari S, Rumping G, Floom B, Lyons S, Stewart FA. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer* 2004;90:1259-1264.
26. Oh J, Cha S, Aiken AH, et al. Quantitative apparent diffusion coefficients and T2 relaxation times in characterizing contrast enhancing brain tumors and regions of peritumoral edema. *J Magn Reson Imaging* 2005;21:701-708.
27. Gibbs P, Liney GP, Pickles MD, Zelhof B, Rodrigues G, Turnbull LW. Correlation of ADC and T2 measurements with cell density in prostate cancer at 3.0 Tesla. *Invest Radiol* 2009;44:572-576.
28. Chen Y, Chang KJ, Hwang LH, Chen CN, Tseng SH. Establishment and characterization of a rectal cancer model in mice: application to cytokine gene therapy. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:388-395.
29. Dong J, Yang J, Chen MQ, et al. A comparative study of gene vaccines encoding different extracellular domains of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in the mouse model of colon adenocarcinoma CT-26. *Cancer Biol Ther* 2008;7:502-509.
30. Contero A, Richer E, Gondim A, Mason RP. High-throughput quantitative bioluminescence imaging for assessing tumor burden. *Methods Mol Biol* 2009;574:37-45.
31. Bloquel C, Trollet C, Pradines E, Seguin J, Scherman D, Bureau MF. Optical imaging of luminescence for in vivo quantification of gene electrotransfer in mouse muscle and knee. *BMC Biotechnol* 2006;6:16.
32. Hiraoka K, Kimura T, Logg CR, et al. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. *Cancer Res* 2007;67:5345-5353.
33. Choy G, O'Connor S, Diehn FE, et al. Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques* 2003;35:1022-1030.
34. Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V, et al. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 2000;7:2036-2040.
35. Van BN, Syha J, Busza AL, et al. Identification of tumor hemorrhage in an animal model using spin echoes and gradient echoes. *Magn Reson Med* 1990;15:121-127.
36. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol* 1986;31:229-234.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis la caractérisation de modèles murins couramment utilisés pour des tests précliniques. Ces données sont essentielles aux approches thérapeutiques que nous souhaitons mettre en œuvre pour bloquer l'angiogenèse ou détruire la vascularisation existante.

1. La vascularisation des tumeurs

1.1 Densité de vaisseaux

En terme de vascularisation, différents profils ont été observés : des tumeurs peu vascularisées (par ex. B16) et des tumeurs très vascularisées (par ex. LLC). Parmi les tumeurs examinées nous n'avons pas observé de corrélation entre le potentiel métastatique des tumeurs rapporté dans la littérature et la densité vasculaire. Ces résultats semblent contradictoires avec ceux rapportés dans la littérature qui décrivent une corrélation entre ces deux paramètres [Zetter, 1998]. Cependant il est important de noter que dans notre étude des tissus de type et d'origine distincts sont comparés et non des tumeurs à différents stades d'évolution. De plus, les résultats obtenus pour la tumeur B16 dans la littérature démontrent que la densité vasculaire n'est pas le seul facteur favorisant la diffusion métastatique mais qu'un environnement hypoxique peut également la favoriser [Rofstad et Danielsen, 1999].

La tumeur C26 a ensuite été développée sur 2 sites d'implantation (sous-cutanée et sur le caecum). La détection de la vascularisation en fonction du temps a été effectuée sur des coupes histologiques (Article 2). Une densité de microvaisseaux (MVD) plus faible dans les temps précoces a été observée pour le modèle orthotopique en comparaison au modèle ectopique (Figure II.3). Ceci indique que le modèle orthotopique serait plus approprié pour l'évaluation des thérapies anti-angiogéniques expérimentales. En ce qui concerne les approches thérapeutiques antivasculaires, les modèles ectopique et orthotopique paraissent également appropriés, étant donné que leur densité vasculaire est équivalente à 11 jours après l'implantation.

1.2 Distribution des vaisseaux au sein des tumeurs

Le profil de distribution de la vascularisation au sein de tumeurs d'une taille d'environ 200 mm³ a également été étudié (Article 1). Nous avons observé une

répartition hétérogène de la vascularisation dans le cas du mélanome B16 et des tumeurs mammaires, mais pour de nombreuses tumeurs (côlon, pancréas, poumon) une répartition homogène des vaisseaux sanguins a été notée.

Lors d'une analyse de la vascularisation du modèle C26, à des temps plus précoces (5 jours post implantation soit $\sim 100 \text{ mm}^3$), une densité plus importante des vaisseaux a été observée en périphérie (Figure II.3).

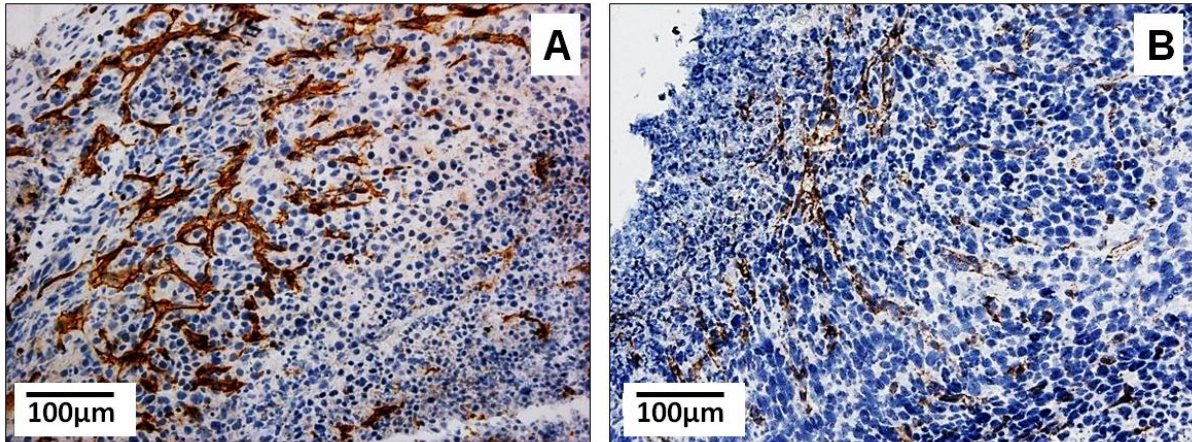


Figure II.3 : Vascularisation des tumeurs C26 5 jours après implantation.

A-modèle ectopique ; B-modèle orthotopique. Le bord de la coupe est situé en haut à gauche de l'image.

1.3 Imagerie 3D de la vascularisation superficielle

La visualisation de l'architecture 3D de la vascularisation superficielle a été effectuée par imagerie de spectrofluorescence après injection d'albumine marquée. Pour le modèle C26 nous avons pu noter que les tumeurs ectopiques étaient hautement vascularisées et que les vaisseaux présentaient de nombreuses arborescences vasculaires. En plus de ce type de morphologie vasculaire nous avons observé dans le modèle orthotopique des zones où les vaisseaux paraissent plus structurés.

Lors de ces études sur la vascularisation tumorale, nous avons également déterminé l'expression de la fraction $\beta 3$ des intégrines et de la sélectine-E.

2. Les intégrines $\alpha v \beta 3$

2.1 Expression

Les intégrines $\alpha v \beta 3$ sont relativement peu exprimées par les cellules endothéliales d'un individu sain et sont considérées comme un outil diagnostique des zones comportant des néo-vaisseaux [Friedlander *et al.*, 1996]. Dans notre étude, la

moitié des tumeurs (7/15) exprime la fraction $\beta 3$ des intégrines. Aucune corrélation n'a été observée entre les types tumoraux et l'expression de cette intégrine. Par exemple sur les trois tumeurs de côlon testées, seule la tumeur C26 exprime la fraction $\beta 3$.

Actuellement nous évaluons la cinétique d'expression de cette intégrine pour la tumeur C26 implantée en sous-cutané ou sur le caecum. Les résultats préliminaires pour une seule tumeur par temps sont présentés Figure II.4. Deux cinétiques différentes sont observées, mais le peu de données analysées ne nous permet pas encore de conclure sur ces résultats.

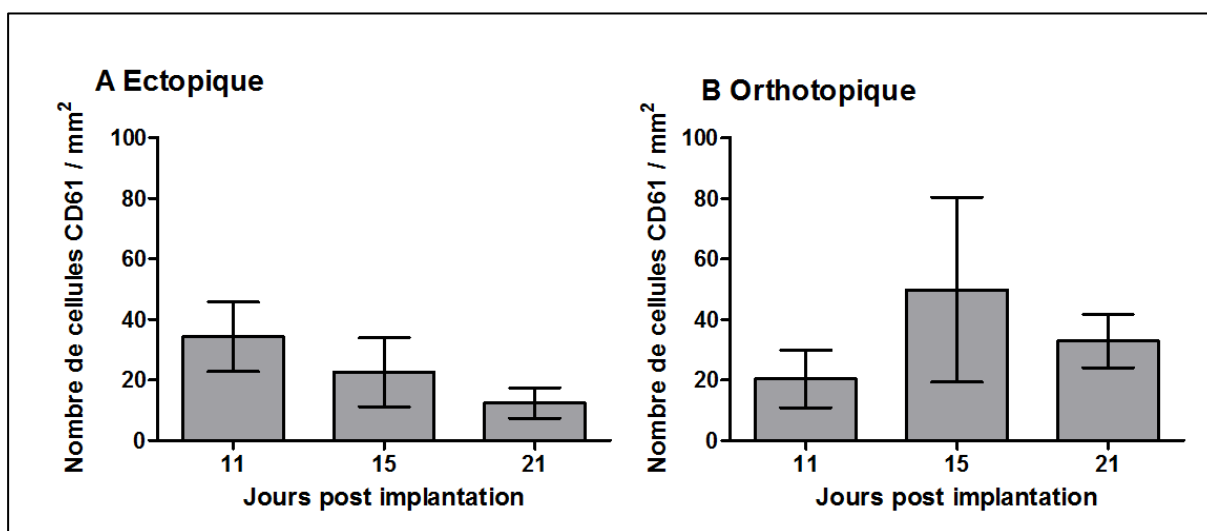


Figure II. 4 : Evaluation de l'expression de la fraction $\beta 3$ des intégrines par l'anticorps CD61 par immunohistochimie.

A- modèle ectopique ; B-modèle orthotopique. Moyenne $\pm$ SEM, 1 tumeur par temps (3 niveaux de coupes, 10 photos par niveau).

Concernant le profil d'expression des intégrines, les tumeurs mammaires et les tumeurs pulmonaires présentent une distribution homogène de leurs intégrines tandis que les tumeurs de mélanome B16 et de côlon C26 présentent une expression plus importante dans la zone périphérique de la tumeur. Ce profil d'expression en périphérie a déjà été décrit dans le cas de la tumeur B16 [Boles *et al.*, 2010].

2.2 Imagerie

En plus des applications thérapeutiques, l'identification de ces CAMs au sein des tumeurs permet l'utilisation de ces connaissances pour l'imagerie moléculaire. Par exemple, l'intégrine $\alpha v \beta 3$ a déjà été ciblée pour des études d'imagerie à l'aide de sondes conjuguées avec le peptide RGD émettant dans le proche infrarouge,

d'analogues multivalents ou de nanoparticules portant des peptides RGD [Desgrosellier et Cheresh, 2010 ; Ye et Chen, 2011 ; Cai et Chen, 2008]. Parmi ces sondes d'imagerie, certaines sont disponibles pour des études précliniques comme par exemple l'AngioStamp™ 700. Ce traceur fluorescent cible spécifiquement les intégrines $\alpha\beta3$. L'image obtenue 24 h après injection de 10 nmoles d'AngioStamp™ 700 est présentée Figure II.5. Cette image confirme l'expression de cette intégrine par la tumeur orthotopique de colon C26 onze jours après implantation. A noter qu'une importante part de la dose injectée a été retrouvée dans la vessie, celle-ci a été cachée sur l'image de fluorescence. Sur l'image ex-vivo (Figure II.5-B), nous pouvons observer la migration de cellules tumorales de la tumeur primaire vers la partie du colon située en amont, indiquant la pénétration de celles-ci dans la muqueuse intestinale.

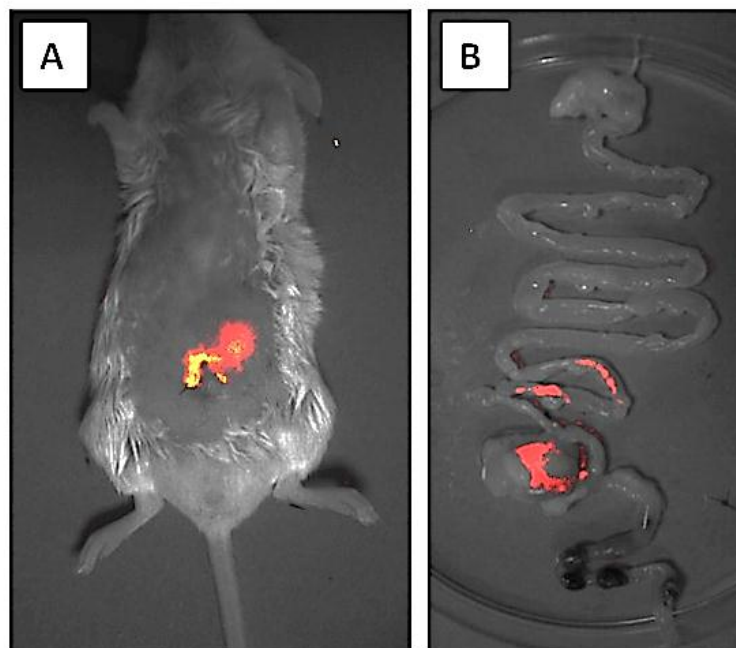


Figure II.5 : Visualisation d'une tumeur de côlon C26 implantée en orthotopique 24 h après injection d'une sonde fluorescente ciblant les intégrines (Fluobeam™ 700, λ_{ex} : 680nm / λ_{em} : >700nm).

A- image in vivo, B-image ex vivo du tube digestif. Les images présentent la superposition de l'image optique de la souris avec l'image de la fluorescence en fausse couleur.

3. Sélectine-E

L'expression de sélectines-E a été retrouvée uniquement dans 4 tumeurs dont le mélanome B16, les carcinomes de côlon C26 et C51 et la tumeur pancréatique PO3. Pour les tumeurs C26 et B16, nous avons observé une localisation de l'expression des sélectines restreinte à une aire située à la périphérie des tumeurs. Ces résultats suggèrent que les zones exprimant plus fortement les sélectines

correspondent aux zones de néo-vascularisation tumorale qui expriment également les intégrines $\alpha\beta3$. Cette localisation périphérique de l'expression a déjà été rapportée dans des études précédentes [Nelson *et al.*, 1994 ; Fox *et al.*, 1995].

Nous noterons que la moitié des tumeurs murines étudiées exprime les intégrines $\alpha\beta3$ et que le quart exprime la sélectine-E. Des études précédentes ont rapporté cette hétérogénéité dans l'expression des CAMs par l'endothélium tumoral, notamment le fait que certaines tumeurs en sont déficientes et d'autres les expriment fortement [Langley *et al.*, 1999]. De plus, cette hétérogénéité d'expression a été montrée dépendante du type tumoral, du mode d'implantation, du site de croissance, et de la souche de souris utilisée [Senger *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002]. C'est pourquoi il est important d'établir une cinétique d'expression des CAMs pour mieux comprendre le développement des tumeurs que nous étudions et adapter nos stratégies thérapeutiques. La cinétique d'expression des sélectines-E dans le modèle C26 en comparant les deux sites d'implantation a été partiellement réalisée et les résultats préliminaires (n=3) sont présentés Figure III.6.

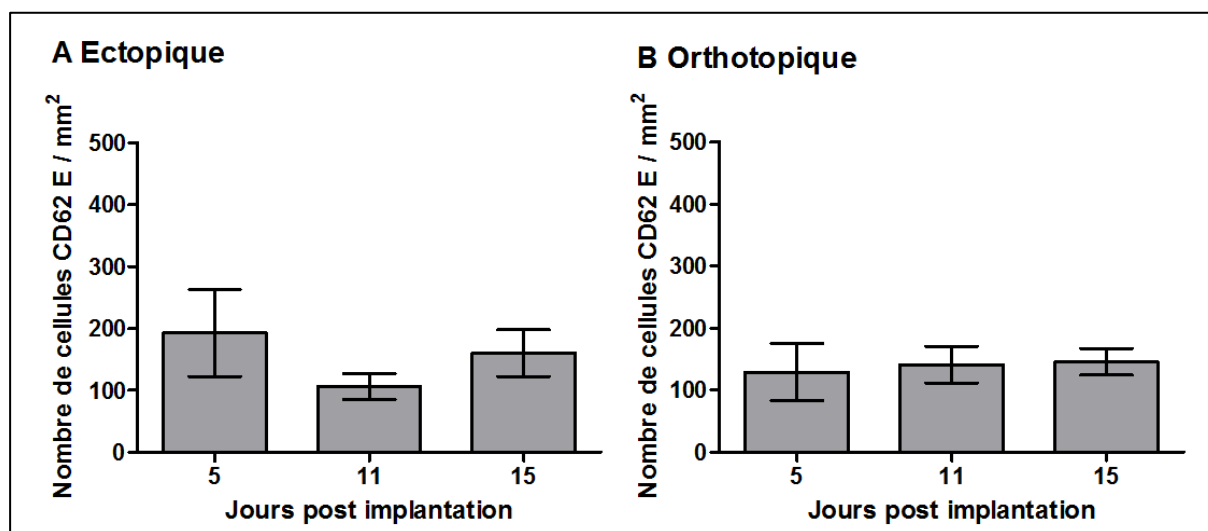


Figure II.6 : Cinétique d'expression de la sélectine E sur le modèle côlon C26 implanté en ectopique A ou en orthotopique B. (moyenne $\pm$ SEM sur 3 tumeurs par temps, coupe au centre des tumeurs, 10 photos par coupe).

Nous observons un taux d'expression relativement constant en fonction du temps, d'environ 100 cellules exprimant la sélectine-E/mm². Une grande variabilité dans les résultats a cependant été obtenue. Il serait donc nécessaire de compléter ces analyses notamment par des temps intermédiaires et des temps plus avancés.

Pour l'évaluation de la validité de stratégies antivasculaires, le modèle LLC sera préférentiellement choisi car celui-ci est fortement vascularisé. Une confirmation sur

la lignée C26 sera réalisée dans deux sites d'implantation différents. Les modèles C26 et B16 ont été identifiés pour l'évaluation de la distribution de particules ciblantes, car ils expriment la fraction $\beta 3$ des intégrines et la sélectine-E.

4. Etude de la croissance des tumeurs côlon C26

Nous avons comparé l'implantation ectopique et orthotopique de la tumeur C26 et nous avons observé une différence significative dans la vitesse de croissance des tumeurs. En effet, comme précédemment décrit pour des tumeurs humaines implantées chez la souris nude [Pocard *et al.*, 1996] et pour la tumeur C26 [Chen *et al.*, 2002], le modèle orthotopique croît plus rapidement que le modèle ectopique. Ces informations très importantes sont généralement peu documentées dans les études d'efficacité thérapeutique.

Nous avons également effectué une étude de la densité des implants tumoraux 15 jours après implantation. Nous avons obtenu une densité comprise entre 1.5 et 1.8 g/cm³ pour les tumeurs C26. Il est important de considérer que les valeurs de densité peuvent varier selon le type de tumeur, le site d'implantation et le volume tumoral. Ces variations dans ces valeurs sont probablement dues aux changements de cellularité, induits par l'hypoxie, la nécrose ou les changements de volume vasculaire.

Au cours de ces travaux, nous avons également évalué différentes modalités d'imagerie afin d'obtenir des informations plus précises sur le modèle de côlon C26. Ces techniques ont été comparées afin de déterminer la technique la mieux adaptée pour effectuer des études de suivi thérapeutique.

4.1 Imagerie Optique

Les données obtenues en bioluminescence ont montré que la tumeur ectopique peut être détectée précocement (4 jours post implantation). Cette technique est très utilisée pour le suivi de la croissance tumorale de modèles de types orthotopiques car elle est très sensible et permet une détection précoce [Rehemtulla *et al.*, 2000 ; Contero *et al.*, 2009]. Dans les tissus superficiels les mesures de bioluminescence *in vitro* et *in vivo* sont corrélées [Bloquel *et al.*, 2006]. Cependant, les conditions hypoxiques et l'absorption de la lumière peut atténuer la détection dans les tissus profonds. Dans nos expériences, les cellules C26-Luc que nous avons utilisées ont été transfectées avec un lentivirus contenant une cassette d'expression constituée du promoteur constitutif fort (PKG) et le gène de fusion EGFP-Luc. Ce gène de

fusion donne habituellement un signal de bioluminescence fort *in vivo* comparé au gène rapporteur luciférase seul. Cependant au-delà du jour 8, nous avons observé un signal de bioluminescence étonnamment diminué, accompagné d'une croissance tumorale réduite des tumeurs C26-luc en comparaison avec les tumeurs C26-wt (wildtype phénotype d'origine). Ceci contraste avec les études de Hiraoka qui a rapporté une croissance tumorale continue corrélée à une augmentation du signal de bioluminescence pendant 28 jours. Ces résultats indiquent la bonne accessibilité du substrat (la luciférine) aux cellules tumorales et l'absence d'élimination du signal par réaction immune [Hiraoka *et al.*, 2007].

Dans notre cas, la présence d'anticorps anti-luciférase dans le sérum des souris porteuses de tumeurs C26-luc en sous-cutanée n'a pas été détectée. Une autre source de réaction immunitaire pourrait être la présence de la cassette d'expression EGFP dans la cassette du lentivirus utilisé pour réaliser les lignées stables. Cependant cette même cassette a déjà été utilisée sur un modèle de tumeurs syngénique chez la souris C57/BL6. Dans ce cas, aucune diminution de l'expression due à une réaction immune envers le transgène n'a été détectée et une bonne corrélation a été décrite entre la croissance tumorale et le gène rapporteur [Choy *et al.*, 2003]. En revanche, Gambotto a mis en évidence une réaction immune contre la GFP médiée par les lymphocytes T chez la souris de souche Balb/c [Gambotto *et al.*, 2000]. Ces résultats peuvent expliquer la diminution du signal que nous avons mesuré. Une part importante des cellules exprimant EGFP-Luc serait donc éliminée, ne permettant l'imagerie *in vivo* de ces cellules que dans des temps précoces.

Il est toutefois possible de suivre les tumeurs colorectales C26 implantées en orthotopique par bioluminescence en disposant d'une lignée cellulaire ne comportant pas la cassette EGFP. La Figure II.7 présente la visualisation du suivi de ces tumeurs par bioluminescence réalisé par Donigan en 2010. Les souris injectées avec 10^6 cellules C26 peuvent être ainsi suivies par imagerie pendant 50 jours. Cependant nous pouvons regretter que la localisation tumorale semble uniquement localisée au site d'injection [Donigan *et al.*, 2010].



Figure II.7 : Suivi de la croissance tumorale d'un carcinome de côlon C26 après injection transanale-rectale [Donigan *et al.*, 2010].

L'imagerie optique offre également d'autres possibilités. En effet, des sondes luminescentes ou fluorescentes peuvent permettre la détection des tumeurs. Une bonne corrélation du signal et de la charge tumorale a été rapportée [Clapper *et al.*, 2011]. Par exemple l'élévation de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) dans le cas de certains cancers peut être exploitée afin de visualiser précocément les tumeurs. C'est le cas de la sonde MMPsens qui n'est fluorescente qu'après modification par les MMPs. La Figure II.8 montre l'image d'une tumeur orthotopique C26 que nous avons réalisée 10 jours post-implantation et 24 h après injection de 2 nmoles de sonde MMPsense™ 680. Un important signal est observé dans la vessie (Figure II.8-A). Une image des organes *ex vivo*, nous permet de confirmer que le signal observé provient de la tumeur (Figure II.8-A). Il est à noter qu'un signal est également visible dans le foie, ce signal provient de la fluorescence de la vésicule biliaire.

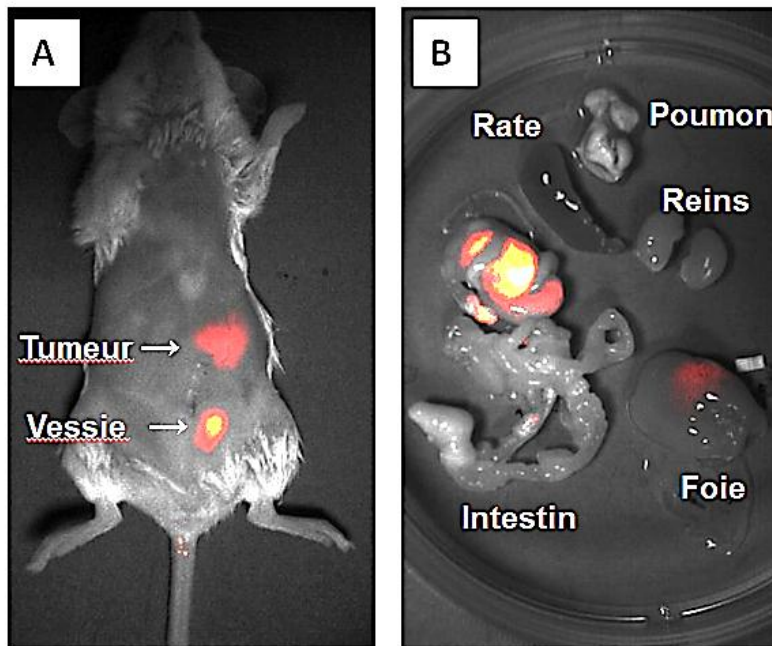


Figure II.8 : Image d'une souris, porteuse d'une tumeur orthotopique C26, 24h après injection de la sonde MMPsens (Fluobeam™ 700, λ_{ex} : 680nm / λ_{em} : >700nm).

A- image *in vivo*, B-image *ex vivo* des organes. Les images présente la superposition de l'image optique de la souris avec l'image de la fluorescence en fausse couleur.

L'évolution actuelle de l'imagerie optique permet d'obtenir des images en 3D pour une meilleure localisation spatiale des tumeurs. De plus, certains systèmes sont équipés de rayons X permettant une localisation du signal de BLI par rapport au squelette de l'animal (cf. Figure II.7).

4.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM fournit une information anatomique avec une grande résolution. Cette technique nous a permis de suivre le volume de tumeurs ectopiques et orthotopiques du jour 5 au jour 21. De plus, il est possible par cette technique de déterminer le pourcentage de zones en hyposignal qui correspond aux zones de nécroses hémorragiques [Van Bruggen *et al.*, 1990]. Cette information peut dans certains cas prédire la réponse de thérapie expérimentale.

D'autres paramètres peuvent également être obtenus par cette technique, en particulier la perfusion tumorale [Sen *et al.*, 2011]. La visualisation de ce paramètre est en cours de mise au point sur le modèle C26. Ce test consiste à administrer en i.v. un agent de contraste (DOTAREM). Une séquence IRM spécifique DCE (*Dynamic Contrast Enhanced*) permet d'obtenir une information en termes de perméabilité des vaisseaux, de volume sanguin ou de concentration de l'agent dans

les tissus. Un exemple est présenté ci-dessous pour une tumeur C26 non traitée implantée en ectopique (Figure II.9).

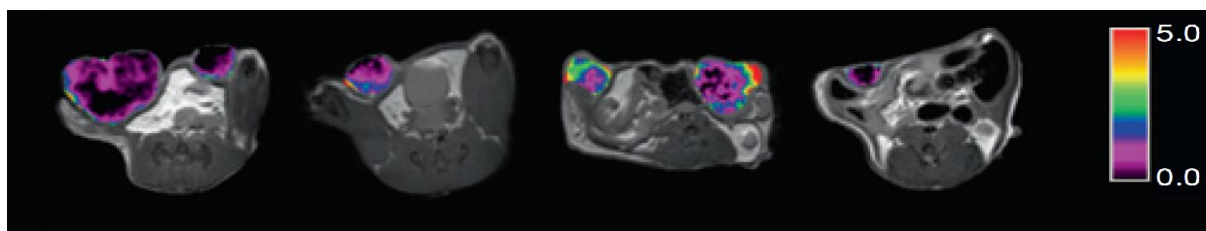


Figure II.9 : Image de la perfusion des tumeurs C26 implantées en ectopique.

L'échelle de couleur correspond au ratio de l'agent de contraste (albumine-gd) par rapport à celui d'un tissu sain (muscle) [Sen *et al.*, 2011].

De plus, de nouvelles techniques exploratoires permettent d'obtenir des informations sur l'élasticité des tissus, sans sacrifice de l'animal : il s'agit de l'élastographie par résonance magnétique (*MR Elastography*). Nous avons utilisé cette technique pour vérifier si les données d'élasticité pouvaient être corrélées à l'état de vascularisation de la tumeur. Nous avons observé expérimentalement une augmentation de l'élasticité intratumorale en fonction du temps pour le modèle ectopique et orthotopique (C26). Cette augmentation a été corrélée avec l'augmentation de la densité de vascularisation. De plus, pour le modèle ectopique, un traitement avec un antivasculaire (la combretastatine, 100 mg/kg) diminue l'élasticité du tissu à 24 h de manière significative. Cette étude, à laquelle j'ai activement contribué a été publiée récemment dans le journal *Radiology* et est présenté en Annexe 1 (*Colon Tumor Growth and Antivascular Treatment in Mice: Complementary Assessment with MR Elastography and Diffusion-weighted MR Imaging*).

Malgré ses nombreux avantages l'IRM est une technique encore onéreuse, qui nécessite une très bonne expertise et demande des temps d'imagerie assez longs. L'obtention de paramètres anatomiques simples requiert une anesthésie de 15 à 20 min par souris, ce qui est limitant pour une étude incluant plusieurs groupes d'animaux (5 à 10 / groupe). Enfin, le traitement des données est également chronophage.

4.3 Echographie ou imagerie ultrasonore

Lors de nos études, nous avons également évalué la faisabilité d'un suivi de la croissance tumorale par imagerie échographique. L'imagerie ultrasonore permet d'obtenir une bonne estimation du volume tumoral, quel que soit le modèle utilisé

(implantation ectopique et orthotopique). Cette technique avait précédemment été décrite comme permettant une évaluation plus précise du volume tumoral en limitant les erreurs de mesure par comparaison aux mesures effectuées avec un pied à coulisse [Cheung *et al.*, 2005]. De plus, l'imagerie ultrasonore est beaucoup plus facile d'utilisation que l'IRM et nécessite un temps d'imagerie réduit de l'ordre de 1-5 min par souris. Ce temps d'imagerie est acceptable pour tester l'efficacité d'agents antitumoraux chez plusieurs groupes de souris.

Dans notre étude, nous avons utilisé une échographie permettant une imagerie 2D. Il est cependant possible d'obtenir une image en 3 dimensions en augmentant légèrement le temps d'acquisition et en utilisant une sonde dédiée. Un exemple d'acquisition et de reconstitution 3D d'une tumeur ectopique C26 est présenté Figure II.10.

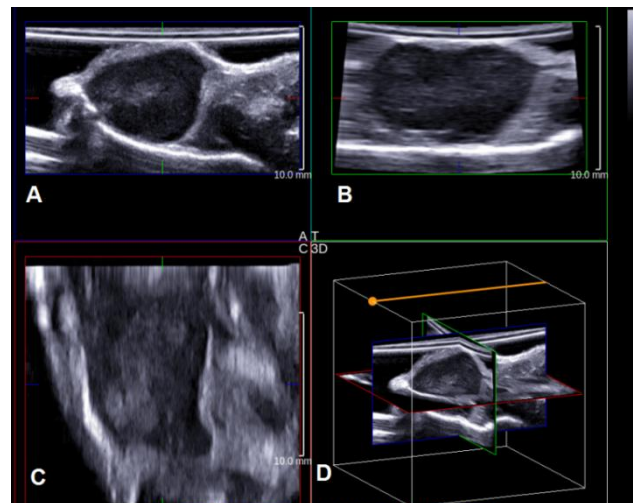


Figure II.10 : Image échographique de la tumeur ectopique C26.

A plan axial, B plan sagittal, C plan coronal et D vue 3D (8 MHz, 192 éléments pitch 0,2 mm, Aixplorer, Supersonic Imagine, Aix en Provence-France).

L'échographie peut également fournir des informations sur le flux sanguin. L'effet Doppler a été testé sur nos tumeurs. Les résultats sont présentés Figure II.11. Seuls les vaisseaux périphériques ont été détectés. Ceci peut être dû à un manque de sensibilité de la sonde utilisée (15 MHz, 256 éléments, pitch 0,125 mm, Vermon, Tours-France) ou à cause du flux sanguin plus réduit dans les micro-vaisseaux tumoraux.

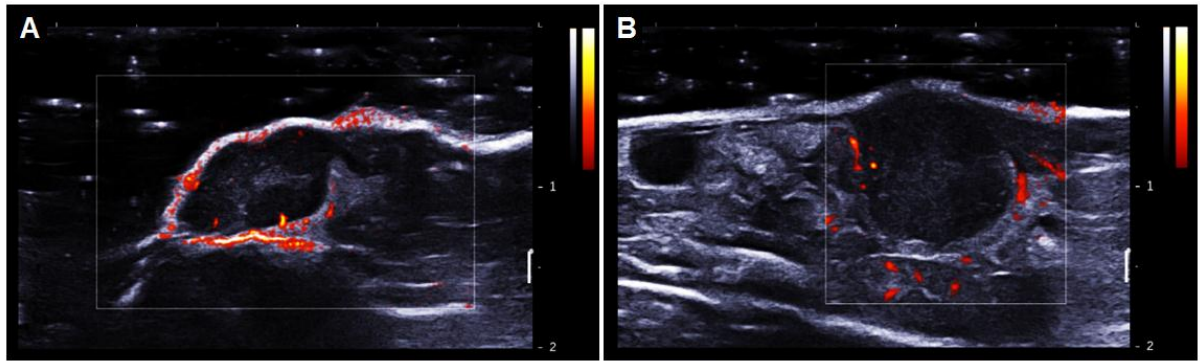


Figure II.11 : Visualisation du flux sanguin par doppler de la tumeur C26. A et B respectivement ectopique et orthotopique (échelle de couleur 0 - 2 m/s).

Cependant, certaines études montrent qu'avec un système adapté, il est possible de suivre une réduction du flux sanguin au sein des tumeurs consécutivement à un traitement antivasculaire (Figure II.12). La Figure II.12-A présente une image de la tumeur avant injection du composé antivasculaire ZD6126 où une réduction du flux sanguin intratumoral est observée 4 h après injection (Figure II.12-B). Cependant, 24 h après l'injection, une revascularisation de la tumeur a été constatée (Figure II.12-C). Dans cette étude, l'imagerie du flux sanguin intratumoral a été réalisée avec une sonde de fréquence centrale de 25 MHz pour une vitesse d'une sensibilité de 0,75 mm/s. La sonde de 15 MHz (réglée à 2 cm/mm) que nous avons utilisé n'était donc pas assez sensible pour la détection d'un flux sanguin de l'ordre du mm/s ce qui explique les images obtenues. Cependant, ce manque de sensibilité sera contourné par l'utilisation d'une nouvelle technique doppler sensible, que nous allons tester prochainement sur nos modèles [Macé *et al.*, 2011].

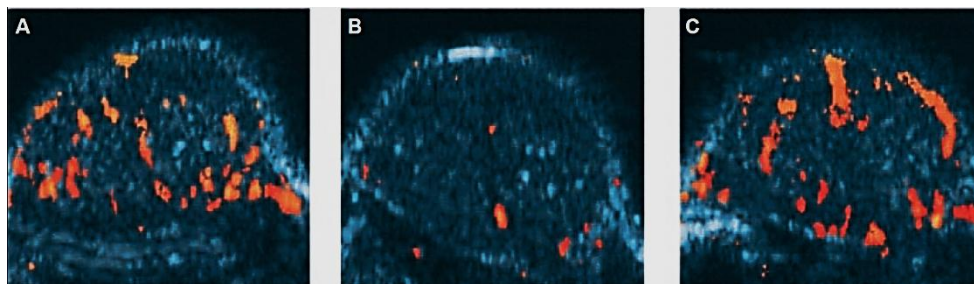


Figure II.12 : Images représentatives d'une tumeur MeWo.

A-avant traitement. B et C respectivement 4h et 24h après traitement avec le ZD6126 (N-acetylcochinol-O-phosphate) à une dose de 20 mg/kg. Coupes axiales des tumeurs, image de 7 mm / 7 mm [Goertz *et al.*, 2002].

De façon à visualiser plus efficacement les microvaisseaux, il peut être intéressant d'associer à l'imagerie US des agents de contraste (Figure II.13). Ceci permet de rehausser le signal et d'améliorer ainsi le rapport signal sur bruit. En effet

Ellegala en 2003 a décrit la visualisation des zones angiogéniques après injection de microbulles ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ [Ellegala *et al.*, 2003].

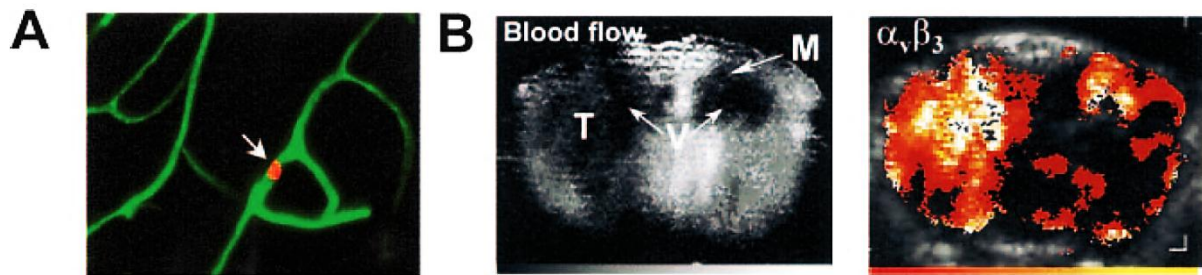


Figure II.13 : Imagerie ultrasonore après l'injection de microbulles.

A-microscopie confocale démontrant la rétention des microbulles ciblant les intégrines dans les néo-vaisseaux tumoraux 28 jours après implantation des tumeurs U87MG. B-gauche image de la perfusion de la tumeur (T), du ventricule (V) et de métastases périventriculaires (M). B-droit Rehaussement du signal obtenu après injection de microbulles ciblant les intégrines [Ellegala *et al.*, 2003].

L'échographie permet également de mesurer l'élasticité du tissu tumoral (*Shear wave elastography*). Nous avons évalué cette méthode sur le modèle de carcinome de côlon C26 implanté en ectopique et en orthotopique (Figure II.14).

Une augmentation de l'élasticité a été mesurée pour les deux modèles jusqu'au jour 13, puis une diminution marquée pour le modèle ectopique et moins évidente pour le modèle orthotopique a été mesurée. Cette diminution est probablement due à une nécrose intra-tumorale. L'influence d'un traitement antivasculaire par la combrétastatine A4 phosphate sur l'élasticité du tissu tumoral est actuellement en cours d'étude.

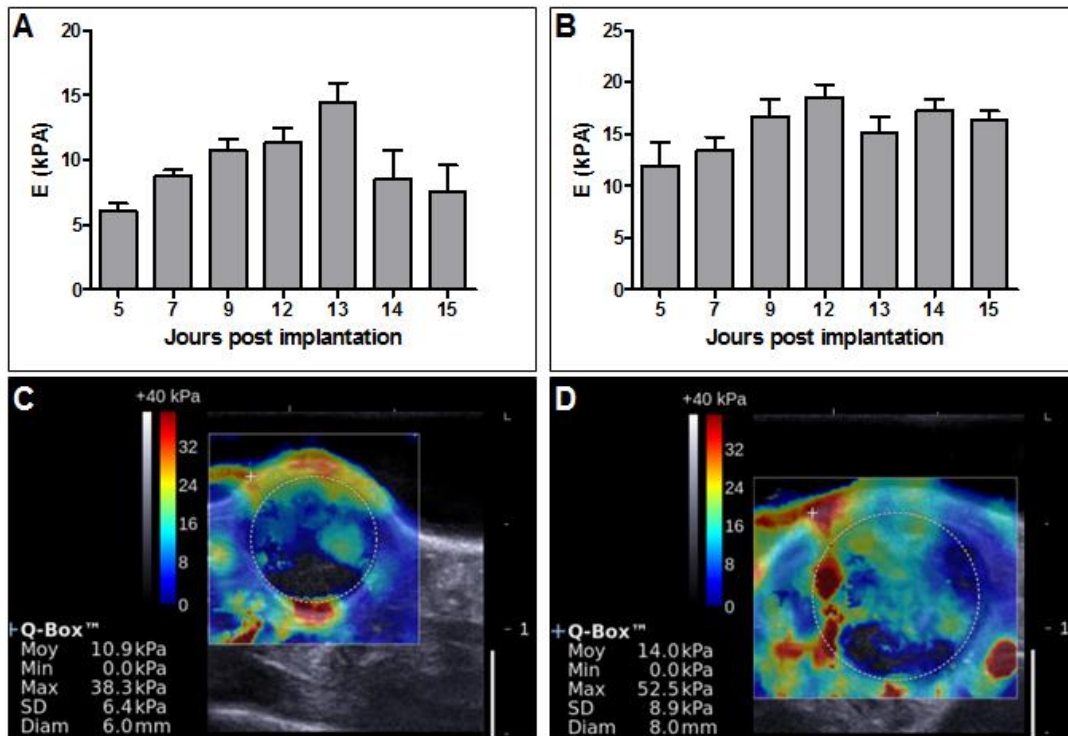


Figure II.14 : Suivi de l'élasticité par échographie pour le modèle ectopique (A) et le modèle orthotopique (B).

Image représentative d'une mesure 12 jours après implantation tumorale pour le modèle ectopique (C) et le modèle orthotopique (D).

Cette technique de mesure de l'élasticité des tissus a été validée dans le cadre d'essais clinique pour la détection de cancer du sein [Tanter *et al.*, 2008, Cosgrove *et al.*, 2012 ; Berg *et al.*, 2012].

Pour l'évaluation de la validité de stratégies antivasculaires, le modèle LLC sera préférentiellement choisi car celui-ci est fortement vascularisé. Une confirmation sur la lignée C26 sera réalisée dans deux sites d'implantation différents. Les modèles C26 et B16 ont été identifiés pour l'évaluation de la distribution de particules ciblantes, car ils expriment la fraction $\beta 3$ des intégrines et la sélectine-E.

CHAPITRE III : APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

I.	LES FLAVONOÏDES.....	123
1.	La structure des flavonoïdes.....	123
2.	Les sources de flavonoïdes.....	123
3.	Les propriétés des flavonoïdes.....	124
4.	Les propriétés antitumorales et anti-angiogéniques des flavonoïdes	124
5.	Propriétés antitumorales et anti-angiogéniques de la fisétine.....	125
II.	LA VECTORISATION DE COMPOSES LIPOPHILES.....	130
1.	Particularités des liposomes	130
2.	Composition des liposomes.....	132
3.	Paramètres d'auto-assemblage	133
4.	Classification des liposomes.....	134
5.	Liposomes conventionnels et liposomes furtifs.....	135
6.	Méthodes d'obtention des liposomes.....	137
III.	MISE AU POINT D'UNE FORMULATION LIPOSOMALE DE LA FISETINE ET ÉVALUATION ANTITUMORALE (RÉSUMÉ DES TRAVAUX RÉALISÉS).....	141
1.	Article 3 : Optimisation d'une forme d'administration de la fisétine	141
2.	Article 4 : Validation de la forme liposomale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	142
IV.	DEVELOPMENT OF A LIPOSOMAL FORMULATION OF THE NATURAL FLAVONOID Fisetin.....	144
1.	Introduction.....	145
2.	Experimental methods	146
3.	Results and Discussion	152
4.	Acknowledgements.....	160
5.	References	161
V.	LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF THE NATURAL FLAVONOID Fisetin IMPROVES BIOAVAILABILITY AND ANTITUMOR EFFICACY (ARTICLE 4).....	164
1.	Introduction.....	166
2.	Materials and methods	167
3.	Results.....	171
4.	Discussion	178
5.	Conclusion.....	179
VI.	CONCLUSIONS ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	184
1.	Optimisation de la formulation	184
2.	Conservation des propriétés biologiques <i>in vitro</i>	186
3.	Pharmacocinétique et biodistribution du liposome.....	187
4.	Effet antitumoral.....	187
5.	Evaluation de l'intérêt d'un ciblage des liposomes fisétine	190

I. LES FLAVONOÏDES

1. La structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes font partie de la classe des composés polyphénoliques que l'on retrouve naturellement dans les aliments provenant de plantes. Ces composés possèdent une structure phenylbenzopyrone commune (C6-C3-C6) et se différencient en sous familles par leur degré de saturation et par l'ouverture de leur cycle central (Figure III.1). On distingue les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavonols, les flavanones, et les flavanonols [Ren *et al.*, 2003].

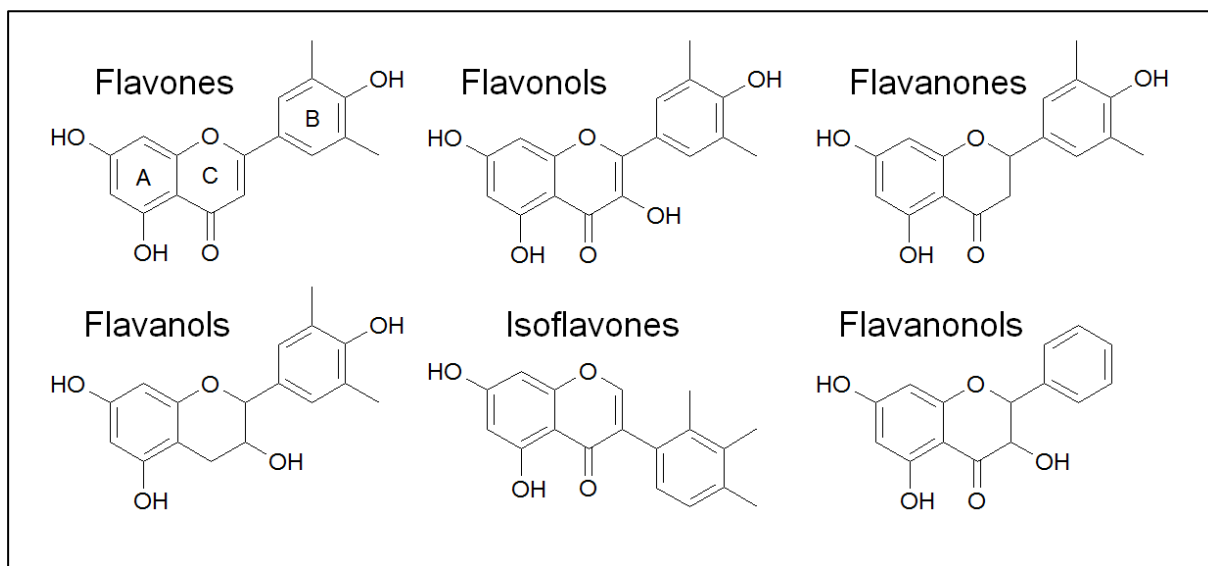


Figure III.1 : Les principaux groupes de flavonoïdes.

2. Les sources de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans certains fruits, plantes, oléagineux et boissons comme le vin et le thé [Rice-Evans *et al.*, 1975, Di-Carlo *et al.*, 1999, Egert et Rimbach, 2012]. Le Tableau III.1 présente quelques sources de flavonoïdes les plus courantes. Ainsi, les flavonoïdes tels que la quercétine et le kaempférol peuvent être consommés quotidiennement puisqu'ils sont présents dans les aliments courants comme les oignons, la laitue, les endives ou même l'huile d'olive.

Famille	Flavonoïdes	Source : plantes et produits médicinaux
Flavones	Chrysine	Peau de fruits, conifères
	Apigénine	Persil, Céleri
Flavones glycosides	Baicaline	Scutellaire du Baïkal (fleur)
Flavonols	Quercétine	Oignon, laitue, brocoli, tomate, canneberge, peau de pomme, huile d'olive, vin rouge, thé, baies.
	Kaempférol	Endives, poireaux, brocoli, radis, thé noir, fruit à grappe
	Myricétine	Airelle à gros fruits, thé vert, vin
Flavonols glycosides	Rutine	Sophora du Japon (arbre), Sarrasin (plante), Eucalyptus, Stellaire intermédiaire (mauvaise herbe)
Flavan3-ols	Catéchine	Vin, thé vert
Flavanones	Naringine	Peau d'agrumes, fruits à grappes.
	Taxifoline	Citron
	Naringénine	Eucalyptus
Flavanonols	Taxifoline	Agrumes
Isoflavones	Génistéine	Soja, Stellaire intermédiaire (mauvaise herbe), puéraire (plante vivace), Sophora du Japon (arbre)

Tableau III.1 : Quelques sources de flavonoïdes [Rice-Evans *et al.*, 1975, Di-Carlo *et al.*, 1999].

3. Les propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont d'autant plus intéressants que ces produits naturels ont montré des propriétés bénéfiques sur l'organisme [pour revue Di-Carlo *et al.*, 1999]. En effet, les principales propriétés attribuées aux flavonoïdes sont de nature antioxydantes [Stoclet et Schini-Kerth, 2011], anti-inflammatoires [Garcia-Lafuentes *et al.*, 2012], et antitumorales [Ren *et al.*, 2003, Gupta *et al.*, 2010, Asensi *et al.*, 2011].

4. Les propriétés antitumorales et anti-angiogéniques des flavonoïdes

Un nombre d'études épidémiologiques a suggéré qu'une absorption importante de flavonoïdes pouvait réduire le risque de cancer [pour revue Le Marchand, 2002]. Toutefois, leur implication réelle dans la prévention est fortement débattue. Il serait en effet nécessaire de compléter les études épidémiologiques par des études interventionnelles pour connaître l'influence d'une alimentation riche en flavonoïdes sur la prévention des cancers. Actuellement, 4 études cliniques interventionnelles sont en cours dont 2 étudient l'influence de la quercétine en complément alimentaire dans la prévention du cancer du côlon et de la prostate [<http://clinicaltrials.gov> : NCT01538316, NCT00003365].

En revanche, l'effet inhibiteur de la carcinogenèse par les flavonoïdes a clairement été démontré chez l'animal [Yang *et al.*, 2001, Ren *et al.*, 2003].

Le premier flavonoïde à avoir été identifié pour ses propriétés antivasculaires chez la souris est l'acide flavone acétique (FAA) [Corbett *et al.*, 1986]. Depuis cette

découverte d'autres flavonoïdes ont été étudiés pour leur activité antitumorale sur des modèles *in vivo* et *in vitro* [pour revue Gupta *et al.*, 2010]. La quercétine est le dérivé le plus étudié, son action anticancéreuse a été rapportée sur un grand nombre de lignées cellulaires (Tableau III.2).

Cancer	Cellules	Flavonoïdes	Références
Cancer oral (humain)	HSC-2, HSG, SCC-25	Chalcones, EGCG, curcumin, génistéine, ECG, quercétine, cisplatine	Shi <i>et al.</i> , 2001 ;Fukai <i>et al.</i> , 2000; Sakagami <i>et al.</i> , 2000; Elattar et Virji, 2000a; Elattar et Virji, 2000b.
Cancer du sein (humain)	MCF-7	Flavones, Flavanones, 2'-hydroxychalcones, flavan-4-ols, daidzéine, génistéine quercétine, lutéoline	Pouget <i>et al.</i> , 2001; Han <i>et al.</i> , 2001
Cancer de la thyroïde (humain)	ARO, NPA, WRO	Génistéine, apigénine, kaempférol, chrysine, lutéoline, biochanine A,	Yin <i>et al.</i> , 1999a; Yin <i>et al.</i> , 1999b
Cancer du poumon (humain)	SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	Flavone, quercétine	Bai <i>et al.</i> , 1998 ; Caltagirone <i>et al.</i> ,1997
Cancer de la prostate (humain)	LNCaP, PC3, DU145	Catéchine, épicatechine, quercétine, kaempférol lutéoline, génistéine, apigénine, myricétine, silymarine	Knowles <i>et al.</i> , 2000; Bhatia et Agarwal, 2001; Kampa <i>et al.</i> , 2000; Agarwal, 2000
Cancer du côlon (humain)	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	Flavone, quercétine, génistéine, anthocyanine	Wenzel <i>et al.</i> , 2000; Kamei <i>et al.</i> , 1998; Kuntz <i>et al.</i> , 1999; Kuo <i>et al.</i> , 1997; Kuo, 1996
Leucémie (humaine)	HL-60, K562, Jurkat	Apigénine, quercétine, myricétine, chalcones	Wang <i>et al.</i> , 1999; Chung <i>et al.</i> , 1999; Csokay <i>et al.</i> , 1997; De Vincenzo <i>et al.</i> , 2000
Mélanome B16 de souris	B16 4A5	Apigénine, lutéoline, kaempférol, quercétine, butéine, isoliquiritigénine, naringénine, génistéine, daizéine	Iwashita <i>et al.</i> , 2000

Tableau III.2 : Lignées cancéreuse sur lesquelles une activité des flavonoïdes a été rapportée [Ren *et al.*, 2003]. EGCG : épigallocatechine gallate, ECG : épicatechine gallate

5. Propriétés antitumorales et anti-angiogéniques de la fisétine

Au sein du laboratoire, 24 flavonoïdes ont été comparés en terme de cytotoxicité sur les cellules B16 (mélanome) et LLC (carcinome pulmonaire de Lewis). De plus, leur effet sur la morphologie des cellules endothéliales a été étudié afin de tenter de prédire une activité anticancéreuse et anti-angiogénique. Seulement 10 des composés testés a présenté une concentration inhibitrice 50 (IC50) à 48 h inférieure à 50 μ M. Sur ces composés, seulement 5 ont montré une capacité à

modifier la morphologie des cellules endothéliales EAHY926. Ces flavonoïdes sont présentés ci-dessous Tableau III.3.

	Cellules B16	Cellules endothéliales EAHY926		
	Cytotoxicité IC ₅₀ (μM) 48 h	Morphologie EC ₅₀ (μM) ^a 2 h	Cytotoxicité IC ₅₀ (μM) 48 h	Fenêtre thérapeutique ^b
Apigénine	22 ± 4	52 ± 7	16 ± 5	0,31
Quercétine	26 ± 4	39 ± 3	36 ± 2	0,91
Fisétine	29 ± 5	16 ± 4	36 ± 5	2,26
Kaempferol	51 ± 5	41 ± 3	31 ± 8	0,76
Morine	298 ± 51	166 ± 6	257 ± 37	1,55

Tableau III.3 : Flavonoïdes induisant une modification de la morphologie des cellules endothéliales (EAHY926).

a EC 50 : Concentration nécessaire pour obtenir une modification de la morphologie pour 50% des cellules (Effective concentration). b La fenêtre thérapeutique pour les cellules endothéliales représente le ratio de l'IC₅₀ à 48h divisé par l'EC 50 [Touil *et al.*, 2009].

La fisétine (3,3',4',7-tétrahydroxyflavone) est le composé le plus intéressant de cette série car il possède la fenêtre thérapeutique la plus large. Il a donc été choisi pour la suite des études (Figure III.2).

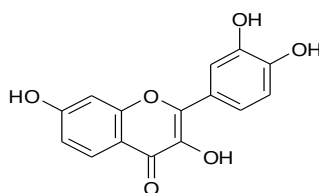


Figure III.2 : Structure chimique de la fisétine (3, 3', 4',7,-tétrahydroxyflavone).

D'autres auteurs ont identifié cette molécule comme cytotoxique *in vitro* sur différents types cellulaires [Ying *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Syed *et al.*, 2011, Suh *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009].

Des effets sur la morphologie des cellules endothéliales et, notamment sur la tubuline ont été ensuite observés. Le profil qui a été visualisé est très différent de ceux couramment obtenus pour des molécules de types poisons du fuseau. (Figure III.2).

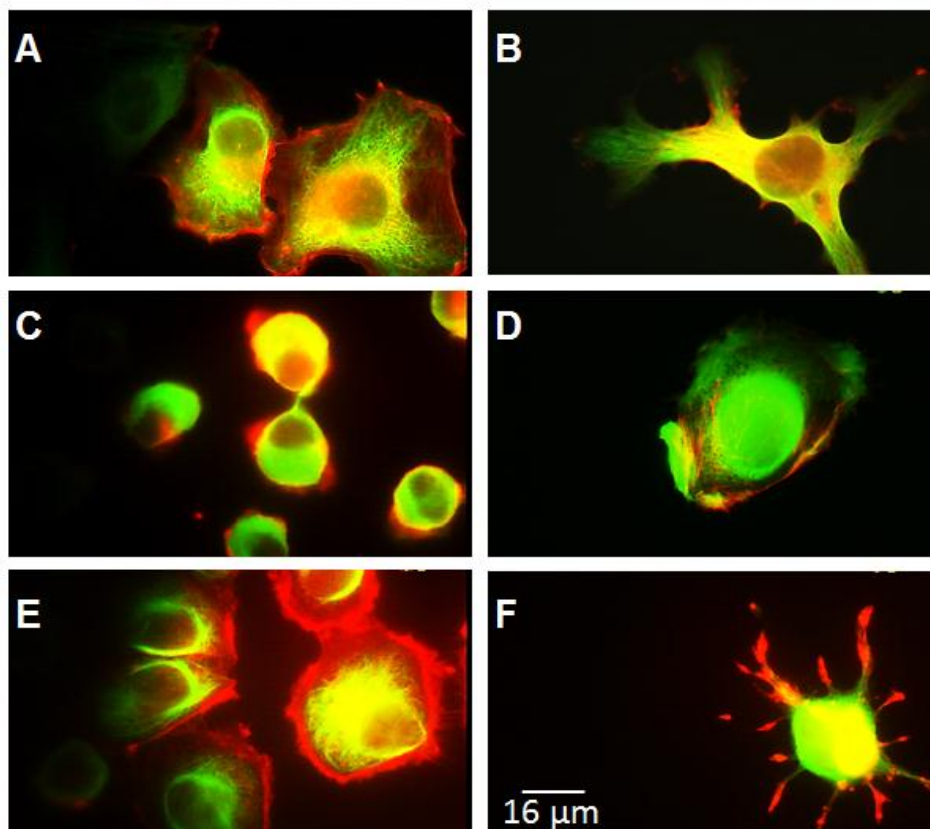


Figure III.3 : Effet morphologique observé sur les cellules endothéliales EAHY926 avec ou sans traitement.

A- Control, B- Fisétine 87.5 μM , C- Colchicine 0.15 μM , D- Combrétastatine A4 1.0 μM , E- Docetaxel 2.5 μM , F- Cytochalasine D 5.0 μM . Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine TRITC (rouge) et les microfilaments de tubuline ont été détectés par immunocytochimie par un anticorps primaire anti α tubuline puis un anticorps secondaire FITC (vert) ; grossissement 1000X, échelle 16 μm [Touil *et al.*, 2009].

Il a été également démontré que la fisétine possédait un effet stabilisant sur les microtubules. Des tests de résistance à la dépolymérisation induite par le froid ont été réalisés. Pour des cellules contrôles, la dépolymérisation complète du réseau de tubuline a été observée en 15 min. Dans le cas de cellules prétraitées avec la fisétine (2 h ; 87,5 μM) une polymérisation du réseau de certaines cellules a été observée jusqu' à 90 minutes après exposition au froid [Touil *et al.*, 2009]. Un des marqueurs de la stabilité des microtubules est l'augmentation de la fraction α acétylée de la tubuline [Westermann et Weber, 2003]. Après analyse par western blot de cellules traitées ou non avec la fisétine, une augmentation de la quantité de tubuline α acétylée d'un facteur 2,4 a été observée par comparaison aux cellules contrôles [Touil *et al.*, 2009].

Ces effets sur la tubuline ont motivé la réalisation de tests plus approfondis sur les cellules endothéliales. Il a été observé que la fisétine inhibait la migration des cellules endothéliales mais également la formation de capillaires *in vitro* à des concentrations non cytotoxiques (22-44 μM). La Figure III.4-A présente cette

inhibition pour un temps d'incubation de 48 h à une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats ont été reproduits *in vivo* et une inhibition de l'angiogenèse a été observée chez la souris dans un test d'implant de Matrigel (Figure III.4-B). En effet, la fisétine incubée avec des cellules de carcinome pulmonaire de Lewis au sein d'une matrice de Matrigel induit une diminution du poids de ces implants. De plus, la quantité en hémoglobine au sein de ces matrices est également diminuée de manière dose dépendante [Touil Y, 2011 ; Annexe 2]. Ces résultats ont par ailleurs été récemment confirmés sur d'autres lignées cellulaires par d'autres auteurs [Bhat *et al.*, 2012 ; Syed *et al.*, 2011].

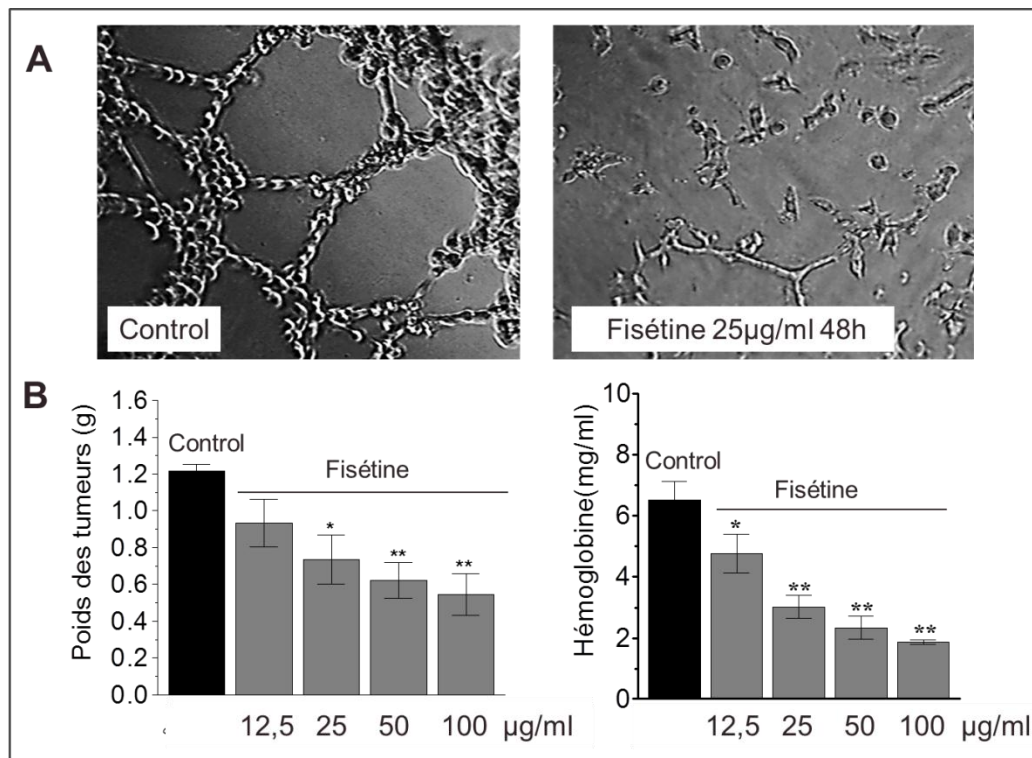


Figure III.4 : Effet anti-angiogénique de la fisétine.

A- test Matrigel d'inhibition de la formation de capillaires *in vitro*. B- Poids des implants matrigel et concentration de ceux-ci 14 jours après implantation *in vivo* chez la souris C57BL6/J [Touil *et al.*, 2011b].

La fisétine est décrite dans la littérature pour ses nombreuses propriétés, mais c'est pour son activité antitumorale, en particulier sur le cancer de la prostate qu'elle a été le plus étudiée [pour revue Adhami *et al.*, 2012]. Dans nos études, chez la souris porteuse de carcinome pulmonaire de Lewis LLC, il a été montré que la fisétine inhibait la croissance tumorale de 67 % (Figure III.5-A) [Touil *et al.*, 2011b]. D'autres auteurs ont également rapporté cette activité *in vivo* notamment sur des modèles de cancer humain du col de l'utérus [Ying *et al.*, 2012], de mélanome humain [Syed *et al.*, 2011] et comme nous l'avons déjà indiqué, de tumeur de la prostate [Khan *et al.*, 2008].

Nous avons également testé une association de la fisétine avec le cyclophosphamide afin d'optimiser le traitement (Figure III.5-A). Dans ce cas, lorsque la fisétine est associée à une faible dose de cyclophosphamide, une augmentation de l'effet antitumoral est mesurée et une inhibition de croissance de 92 % a été notée [Touil *et al.*, 2011b].

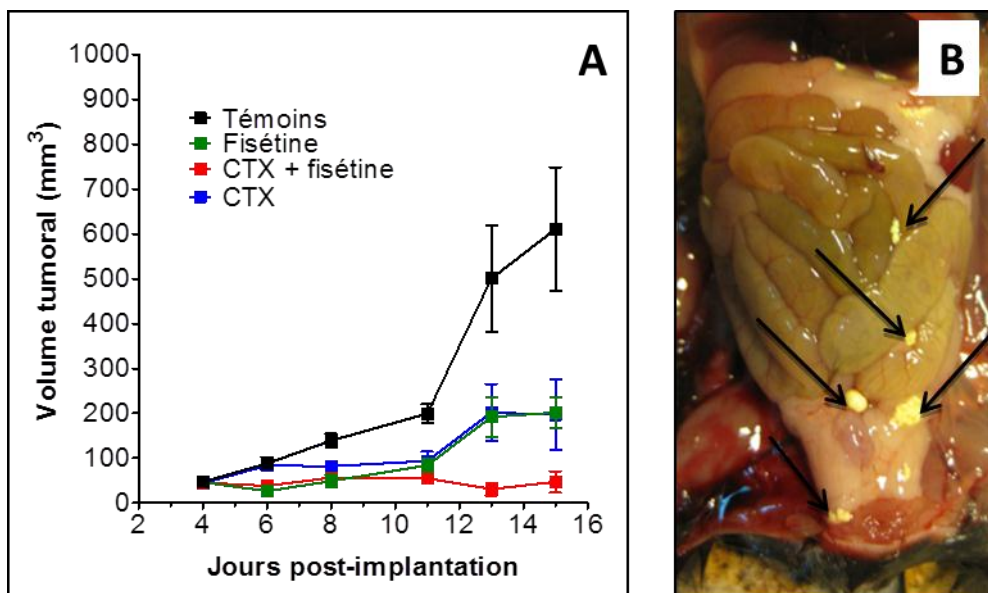


Figure III.5 : Activité antitumorale de la fisétine.

A- Activité antitumorale *in vivo* de la combinaison de la fisétine (223 mg/kg) avec le cyclophosphamide (30 mg/kg) [Touil *et al.*, 2011b]. B- Précipités de fisétine observés dans la cavité péritonéale après traitement (jour 15).

Cependant, la faible solubilité aqueuse de la fisétine limite son utilisation pour un développement clinique [Guzzo *et al.*, 2006 ; Ragelle *et al.*, 2011]. De plus, il a été observé une mauvaise diffusion du principe actif chez la souris avec la présence de précipités dans la cavité péritonéale après administration répétée (Figure III.5-B). Nous avons donc choisi de développer une formulation adaptée à l'administration de la fisétine afin de mieux contrôler sa libération *in vivo*, augmenter sa biodisponibilité et réduire les doses de principe actif à administrer.

II. LA VECTORISATION DE COMPOSES LIPOPHILES

La vectorisation d'agents thérapeutiques permet de modifier ses propriétés pharmacocinétiques comme le franchissement de barrières anatomiques et physiologiques. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les vecteurs utilisés peuvent être de types particuliers comme les nanoparticules et les liposomes ; moléculaires comme les polymères, les cyclodextrines et les anticorps ; ou bien vivants tels que les virus, les bactéries et les cellules [Définition GTRV, groupe thématique de recherche sur les vecteurs <http://www.gtrv.fr/>].

Toutefois, ces vecteurs ne sont pas tous adaptés à la vectorisation de principes actifs lipophiles, dont la solubilisation et le transport demeurent des problèmes majeurs en pharmacologie. Parmi les formulations nanoparticulaires les plus adaptées, nous pouvons citer les émulsions huile/eau, les liposomes et les cyclodextrines. Au laboratoire, nous avons choisi de développer ces trois types de formulations pour l'administration de la fisétine afin de définir quelle serait la plus appropriée en fonction du mode d'administration. Nous avons développé une forme liposomale, dont l'optimisation et l'évaluation biologique sont développés dans ce chapitre par la présentation de deux articles, l'un publié dans *International Journal of Pharmaceutics*, l'autre soumis à *Journal of Controlled Release*.

Le choix de la formulation de type liposomale a été motivé par des études préliminaires réalisées par Yuan en 2006 avec la quercétine un composé de la même famille. Au cours de cette étude le liposome de quercétine (Q-PEGL) a permis d'augmenter significativement la solubilité aqueuse de la quercétine, de prolonger son temps de circulation dans le sang et d'augmenter son efficacité antitumorale [Yuan *et al.*, 2006].

En parallèle, une forme de nanoémulsion a été développée. J'ai évalué cette formulation *in vivo*, l'article qui a été publié dans *l'International Journal of Pharmaceutics* est présenté à l'Annexe 3. Enfin, une forme cyclodextrine est actuellement en cours de développement dans le cadre d'une administration orale de la fisétine.

1. Particularités des liposomes

Les liposomes initialement décrits par Bangham, ont été développés dans le but de mimer les modèles de membranes biologiques [Bangham *et al.*, 1965 ; Bangham, 1978] Depuis, leurs applications s'est développées et ils sont actuellement essentiellement utilisés comme vecteur d'acide nucléique ou de médicament.

Les liposomes peuvent permettre l'encapsulation de médicaments de nature hydrophile ou hydrophobe. Selon la nature du principe actif, sa localisation au sein du liposome sera différente. Lorsque le médicament est soluble dans l'eau il se localisera à l'intérieur du cœur aqueux, alors que s'il est lipophile il s'insèrera au sein des bicouches lipidiques [Yu et Lin, 2000 ; Redziniak, 2003 ; Metselaar *et al.*, 2002]. Dans le cas d'un composé amphiphile, sa localisation se situera au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides [Espuelas *et al.*, 2003 ; Gulati *et al.*, 1998] (Figure III.6).

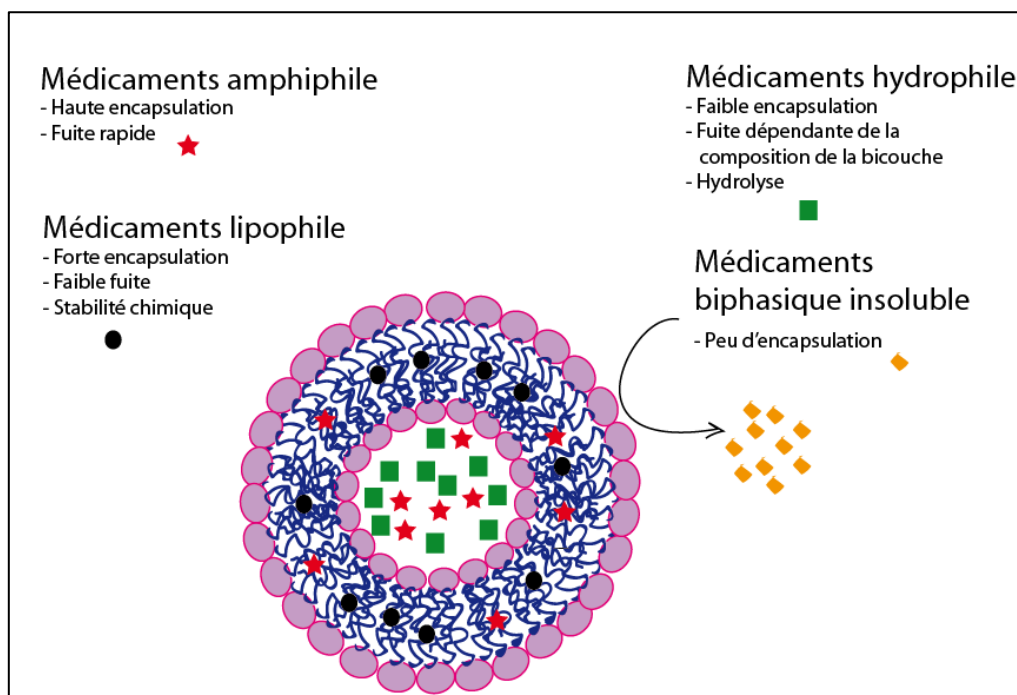


Figure III.6 : Localisation des principes actifs au sein des particules liposomales [Gulati *et al.*, 1998].

Les liposomes présentent de nombreux avantages, ils protègent le principe actif de la dégradation dans les milieux biologiques et permettent sa libération contrôlée. Leur délivrance plus spécifique au sein d'organe peut aussi contribuer à réduire les effets secondaires des médicaments encapsulés. En termes de pharmacocinétique, ils peuvent permettre une prolongation du temps de circulation dans le sang et une élimination moins rapide du principe actif. Enfin, un ciblage passif ou actif permet un adressage plus spécifique à certains tissus ou organes. Cependant, ces avantages sont pondérés par la nature de l'agent à encapsuler, la taille des particules et leur charge de surface. De plus, d'autres limites liées à leur préparation peuvent diminuer leur efficacité, comme la facilité de préparation en grosse quantité et le pourcentage de principe actif encapsulé.

2. Composition des liposomes

Les liposomes sont composés de lipides, en général des phospholipides, et d'un stabilisant colloïdal.

2.1 Les Phospholipides :

La plupart des phospholipides (PLs) sont les phosphoglycérides, ils possèdent un squelette composé de glycérol sur lequel sont greffés deux chaînes aliphatiques (acide gras) et un groupement polaire (Figure III.7).

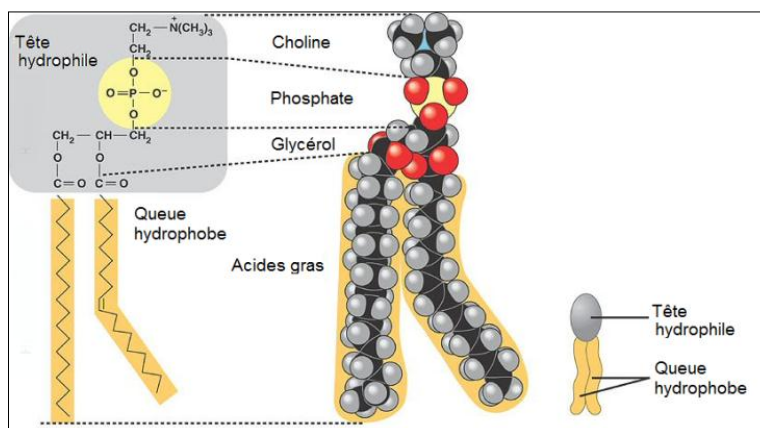


Figure III.7 : Structure des phospholipides : exemple de la phosphatidylcholine [http://aecbio11.wikia.com/wiki/1.2_Cell_Membrane_Structure].

Les PLs les plus abondants dans les plantes et les animaux sont la phosphatidylcholine (lécithine) et la phosphatidyléthanolamine. Ces deux composants sont les constituants majeurs des membranes biologiques [Vemuri et Rhodes, 1995]. Il existe de nombreux PLs synthétiques disponibles commercialement qui peuvent être utilisés dans les préparations liposomales et qui diffèrent par la longueur de leur chaîne, par le nombre d'insaturations sur la chaîne lipidique.

2.2 Les stéroïdes

Les stéroïdes les plus utilisés dans les préparations liposomales sont le cholestérol et ses dérivés. En effet, le cholestérol comme les phospholipides, font partie de la composition normale des membranes biologiques. L'inclusion de cholestérol dans la fabrication des liposomes permet d'augmenter la fluidité de la double couche lipidique, de réduire la perméabilité de cette membrane aux molécules lipophiles et d'augmenter la stabilité de la formulation en présence de fluides biologiques, tels que le sang et le plasma. Le cholestérol va s'orienter dans la

couche de phospholipides avec sa partie hydroxyle au niveau de la tête polaire, et sa chaîne carbonée s'insérera au cœur de la partie hydrocarbonée de la membrane (Figure III.8).

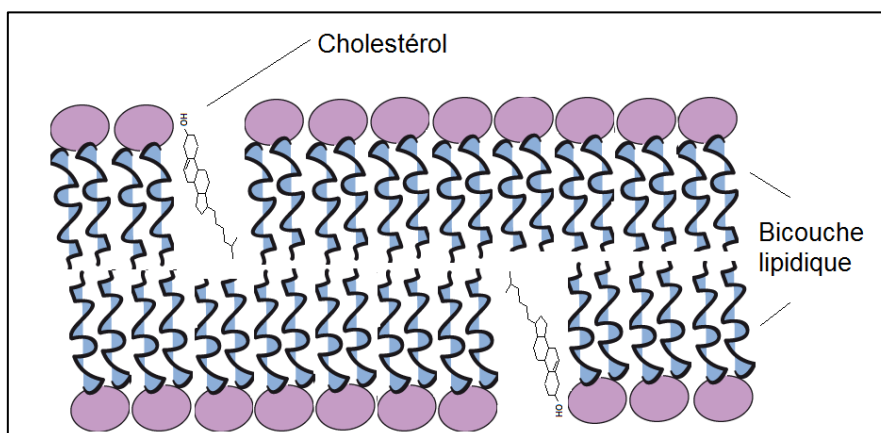


Figure III.8 : Positionnement du cholestérol dans une bicouche.

Il est également possible d'inclure d'autres types de molécules dans la bicouche de phospholipides tels les gangliosides et la sphingomyeline, qui tendent à augmenter le temps de circulation des particules tout en limitant les interactions non spécifiques [Allen et al. 1991]. Les formules utilisées en clinique, ou actuellement en développement, utilisent le plus souvent la phosphatidylcholine et le cholestérol comme composants lipidiques.

3. Paramètres d'auto-assemblage

Le choix des lipides est déterminant puisqu'il va définir la structure tridimensionnelle des vésicules formées. La structure formée peut être calculée par la formule suivante $p = v/(a \times lc)$ où « p » correspond au paramètre d'auto assemblage, « v » au volume de la fraction hydrocarbonée, « a » à l'aire effective de la tête polaire et « lc » à la longueur de la chaîne. Ainsi, des lipides monocaténaires à large tête polaire vont former des micelles sphériques, tandis que ceux à petite tête polaire forment des micelles cylindriques. Des lipides bicaténaires à large tête polaire et à chaînes fluides vont former des vésicules fluctuantes alors que ceux ayant des chaînes lipidiques constituées de lipides anioniques de grande force ionique formeront des bicouches planes. Enfin des lipides non ioniques bicaténaires ayant une petite tête polaire et des chaînes poly-*cis* insaturées soumis à une température élevées formeront des micelles inverses (Tableau III.4) [Balazs et Godbey, 2011].

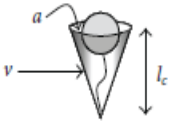
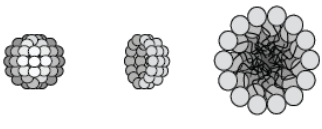
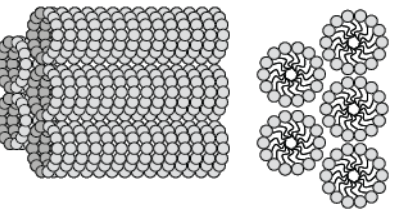
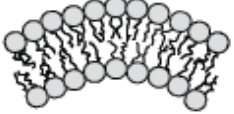
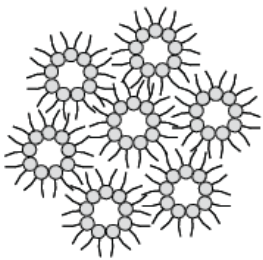
Lipides	$p = v/(a \times l_c)$	Forme	Structure
Lipides monocaténaire à large tête polaire	$< 1/3$	 Cône	 Micelles sphériques
Lipides monocaténaire à petite tête polaire	De $1/3$ et $1/2$	 Cône tronqué	 Micelles cylindriques
Lipides bicaténaires à large tête polaire	De $1/2$ à 1	 Cône tronqué	 Vésicules fluctuantes
Lipides bicaténaires à petite tête polaire	~ 1	 Cylindre	 Bicouches planes
Lipides non ioniques bicaténaires	> 1	 Cône tronqué inversé	 Micelle inverses

Tableau III.4 : Disposition des phospholipides en fonction de leur composition [Balazs et Godbey, 2011].

4. Classification des liposomes

Il est possible de classer les liposomes selon leur taille et le nombre de leurs bicouches (Figure III.9). On distingue les liposomes d'une taille inférieure à 200 nm appelée les SUV (*small unilamellar vesicle*), de ceux ayant une taille comprise entre 200 et 1000 nm les LUV (*large unilamellar vesicle*). Si leur taille est supérieure à 1000 nm on parle alors de GUV (*giant unilamellar vesicles*). Les particules possédant plusieurs bicouches lipidiques sont appelées MLV (*multi lamellar vesicle*) généralement leur taille est supérieure à 200 nm et peut atteindre dans certains cas une taille supérieure à 1000 nm [Lorin et al., 2004].

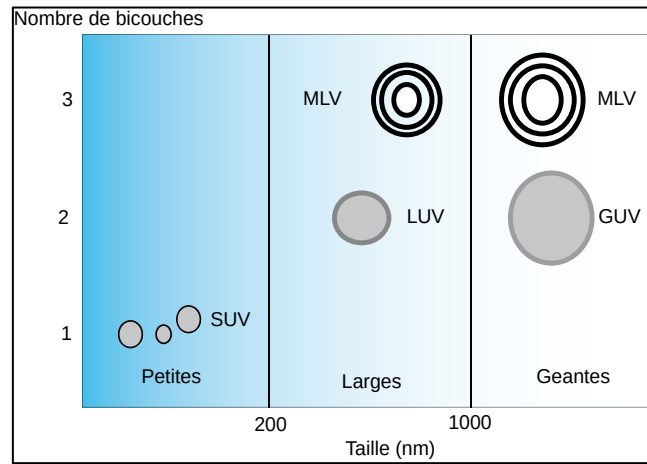


Figure III.9 : Classification des liposomes d'après leur taille et le nombre de bicouches [Lorin et al., 2004].

5. Liposomes conventionnel et liposomes furtifs

5.1 Les liposomes conventionnels ou de première génération

Les liposomes conventionnels, appelés liposomes de 1ère génération (Figure III.11-A), sont constitués de phospholipides naturels non chargés ou anioniques, qui ne possèdent pas de recouvrement. Lors de leur administration dans la circulation sanguine, les liposomes conventionnels interagissent avec les protéines plasmatiques. En effet, des interactions hydrophobes se créent entre les opsonines (immunoglobulines, protéines du complément, fibronectine, albumine) et la surface des liposomes (Figure III.10). Ces opsonines sont ensuite reconnues par les macrophages ou les cellules de Küpffer qui présentent à leur surface des récepteurs spécifiques qui facilitent leur capture par ces cellules.

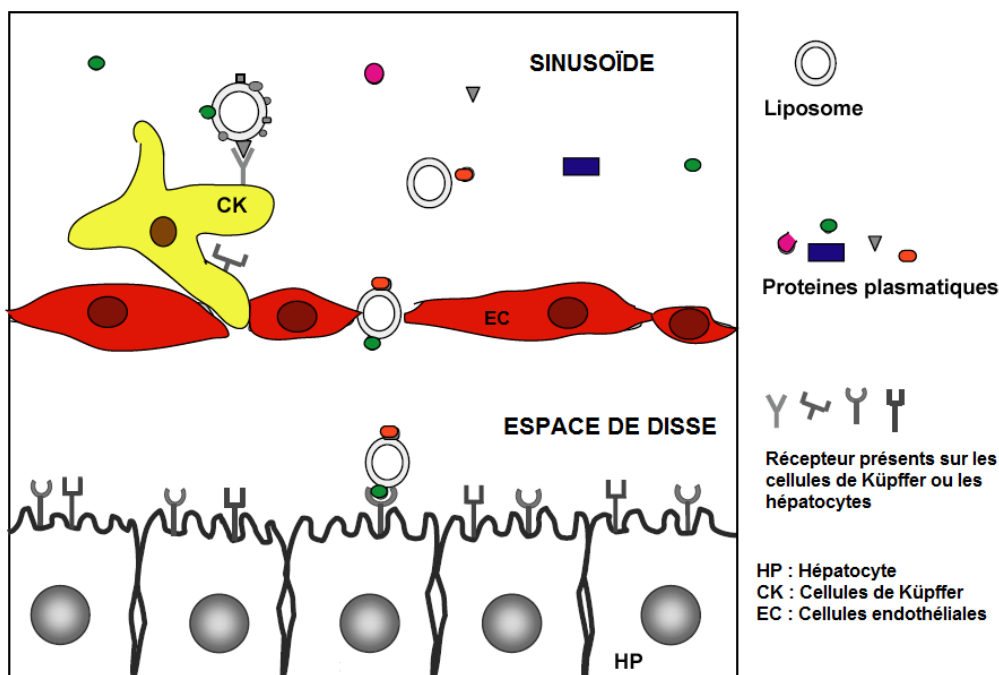


Figure III.10 : Mécanisme proposé de la capture macrophagique et hépatique des liposomes conventionnels [Yan *et al.*, 2005].

5.2 Les liposomes furtifs ou de deuxième génération

Afin de limiter la capture par le système réticulo-endothélial, plusieurs méthodes ont été développées. Les liposomes qui en sont issus sont appelés de 2^{ème} génération (Figure III.11-B). La principale méthode de protection contre l'élimination des liposomes par le système réticulo-endothélial (RES) est la pégylation, qui consiste en la fonctionnalisation des particules avec du polyéthylène glycol (PEG). Cette modification de surface dépend de différents paramètres comme le poids moléculaire et la densité de PEG en surface. Cette pégylation permet l'augmentation du temps de demi-vie des liposomes par la création d'une aire hydrophile à leur surface conduisant à une répulsion stérique et évitant ainsi l'adsorption d'opsonines [Woodle et Lasic, 1992 ; Gabizon *et al.*, 1996]. Par exemple dans l'étude de Han, la doxorubicine injectée par voie intraveineuse à des souris présente un temps de demi-vie (T1/2) de 1,7 h, les liposomes conventionnels un T1/2 de 2,3 h tandis que les liposomes pégylés ont une demi vie de 12,8 h [Han *et al.*, 2007]. Ainsi recouverts, ces liposomes sont appelés furtifs ou de 2^{ème} génération [Moghimi *et al.*, 2001].

5.3 Liposome de troisième génération

Les liposomes ciblant spécifiquement un tissu sont appelés liposomes de 3^{ème} génération (Figure III.11-C). Il est en effet possible d'introduire un ligand spécifique lié covalamment à la surface des liposomes ou introduit dans la bicouche par l'intermédiaire d'un lipide ou lipide-PEG portant le ligand à son extrémité. Les types de ligands et de modifications permettant le ciblage actif des tumeurs ont été détaillés dans le paragraphe sur le ciblage actif dans l'Introduction.

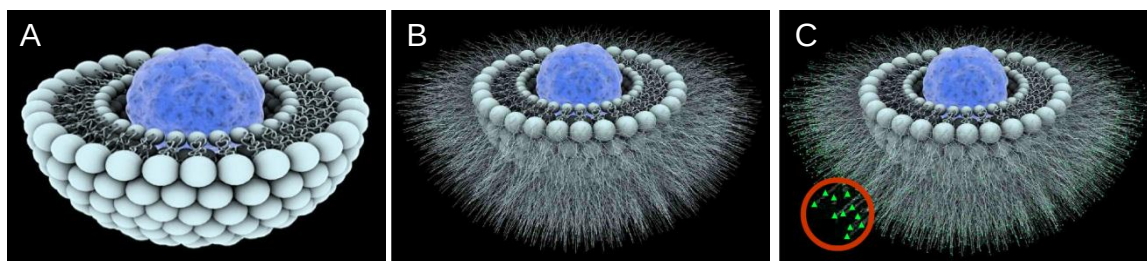


Figure III.11 : Liposome de 1^{ère} A, 2^{ème} B, et 3^{ème} C génération . [photothèque CNRS /F.caillaud].

6. Méthodes d'obtention des liposomes

Il existe différentes méthodes de préparation des liposomes mais peu sont capables de fournir un fort taux d'encapsulation. C'est pourquoi, avant la préparation de nouvelles formulations, une étape d'optimisation du processus de fabrication est souvent nécessaire. Elle va dépendre de la taille souhaitée des liposomes, de l'application (forme à libération prolongée ou non) et de la nature (hydrophile ou lipophile) du principe actif. Les 2 principales techniques utilisées dans les laboratoires de recherche pour fabriquer des liposomes sont l'injection éthanolique et l'hydratation d'un film lipidique. Ces techniques sont adaptées à la formulation de petites quantités de liposomes. Cependant, il existe d'autres techniques comme la formation de liposomes par méthode physique et la méthode de la meringue plus utilisée dans le milieu industriel. Toutes ces méthodes sont décrites succinctement dans le paragraphe suivant.

6.1 L'injection éthanolique

L'injection éthanolique repose sur la précipitation dans un solvant aqueux de lipides en solution dans un solvant organique. On obtient ainsi la formation spontanée de liposomes de taille nanométrique. L'utilisation de cette méthode nécessite la solubilité des lipides dans l'éthanol et un rapport éthanol / solvant

aqueux important. Brièvement, les lipides sont dissous dans l'éthanol puis cette solution est injectée goutte à goutte sur un volume d'eau sous agitation. Enfin, l'excès d'éthanol et une partie de l'eau sont évaporés pour réduire le volume de la suspension (par ex. 1 ml) (Figure III.12). En formant des vésicules, les lipides encapsulent le principe actif hydrophile solubilisé dans l'eau.

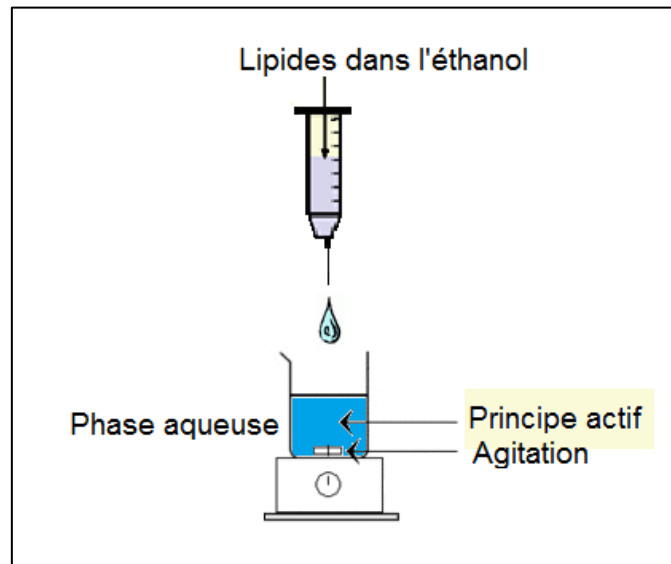


Figure III.12 : Formation de liposomes par injection éthanolique.

6.2 Hydratation d'un film lipidique

Dans un premier temps, les lipides sont solubilisés dans un solvant organique (Figure III.13-1) comme, par exemple, le chloroforme. Puis, une évaporation sous vide est réalisée afin de former une fine couche de lipides sur la paroi du ballon (film) (Figure III.13-2). Les MLVs de 500 nm à 1 µm environ sont ensuite formées par hydratation du film sous agitation lente (Figure III.13-3). Il est ensuite nécessaire de réduire la taille des particules par une méthode physique comme la sonication ou l'extrusion afin d'obtenir une population homogène de vésicules (Figure III.13-4). Lorsque l'on souhaite incorporer un principe actif (PA) lipophile, celui-ci est introduit au même moment que les lipides afin de le solubiliser dans un solvant organique (Figure III.13-1). En revanche, lorsque le PA est hydrophile, il est introduit dans la préparation lors de l'étape d'hydratation (Figure III.13-3). Enfin, la séparation du principe actif non encapsulé est réalisée à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique, par dialyse ou centrifugation (Figure III.13-5).

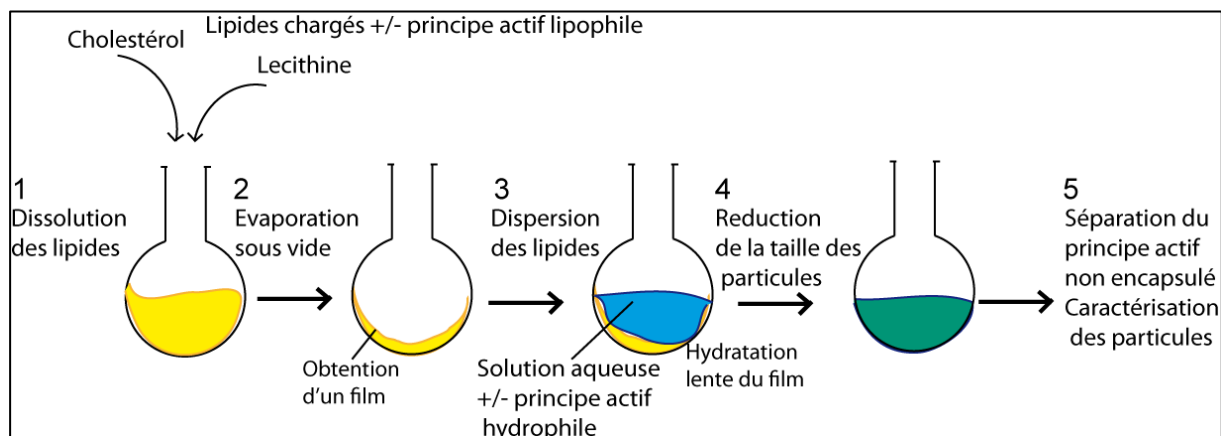


Figure III.13 : Formation de liposomes par la méthode d'hydratation de film lipidique.

6.3 Méthode de la meringue (*Lipid cake formation*).

Les lipides sont dissous dans un solvant organique dans une cuve équipée d'un barreau aimanté. Le solvant organique est alors évaporé sous vide et l'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un barreau aimanté jusqu'à l'obtention d'un extrait sec. L'étape d'hydratation est alors effectuée à température ambiante sous agitation. Les liposomes sont ensuite extrudés pour l'obtention d'une population homogène. Cette méthode proche de la méthode du film diffère par son étape d'évaporation. En effet l'évaporation par méthode du film est progressive et nécessite un contrôle régulier pendant la formation du film. La méthode du film est moins facilement adaptable à grande échelle que la méthode de la meringue, en raison du risque de former un film non homogène.

6.4 Formation de liposomes par méthode physique

Avec cette technique, les composants sont directement solubilisés dans le solvant aqueux (Figure III.14). La formation des liposomes est réalisée soit par sonication discontinue, soit par homogénéisation (Ultraturrax). Le protocole exact, c'est-à-dire le nombre de cycles, le temps et la puissance doivent nécessairement être optimisés en fonction des lipides utilisés et du principe actif incorporé dans la préparation. Les paramètres physicochimiques tels la taille et l'index de polydispersité sont contrôlés au cours des différents cycles du processus. Grâce à cette méthode, il est possible d'obtenir des liposomes de taille nanométrique sans passer par une étape d'extrusion. En revanche, en raison du niveau d'énergie appliqué, cette méthode n'est pas adaptée à tous les principes actifs.

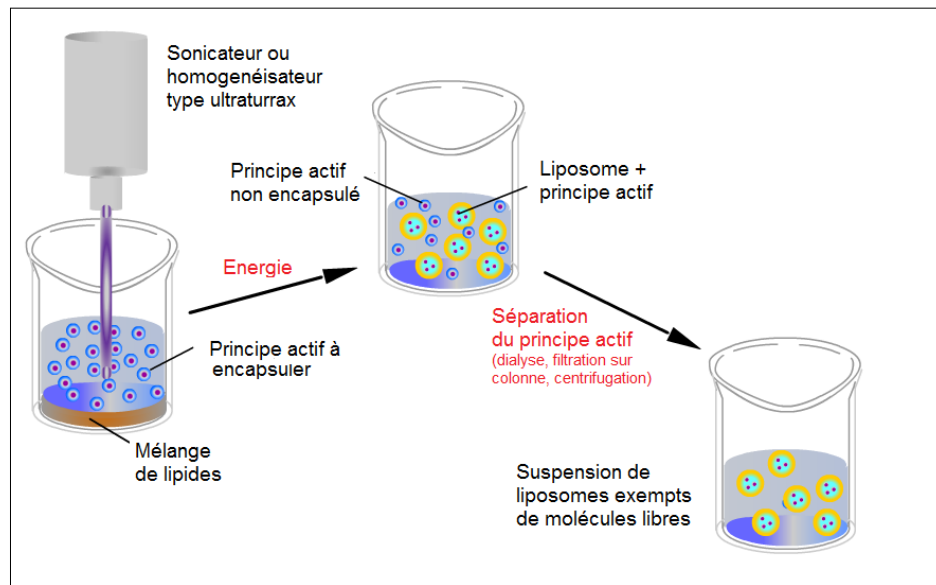


Figure III.14 : Préparation des liposomes par méthode physique (Schéma adapté de <http://www.espace sciences.com/SMO/Liposomes/Cours.htm>).

III. MISE AU POINT D'UNE FORMULATION LIPOSOMALE DE LA FISETINE ET EVALUATION ANTITUMORALE (RESUME DES TRAVAUX REALISES)

1. Article 3 : Optimisation d'une forme d'administration de la fisétine

Au cours de cette étude, nous avons dans un premier temps élaboré une formulation liposomale de la fisétine sur des petites quantités (1-10 mg/ml). Dans un deuxième temps, nous avons réalisé sa production à plus grande échelle (100 mg/ml), permettant aussi une évaluation *in vivo* chez la souris. Cette production en plus grande quantité a nécessité des ajustements de formulation telle l'adaptation de la méthode de préparation et la réduction du coût des composants. Enfin, dans un troisième temps, les formulations ont été testées *in cellulo* pour vérifier la conservation de l'activité du principe actif et son internalisation par les cellules.

Pour concevoir la forme liposomale, nous avons dû tenir compte de la lipophilie du principe actif. Les différents paramètres ayant pondéré notre choix sont décrits ci-après. Nous avons veillé à ne pas introduire trop de cholestérol dans la formulation puisqu'il pouvait provoquer une élimination de la fisétine de la bicouche. Pour obtenir une libération prolongée du principe actif l'obtention de formulations de type MLV est nécessaire. Ce type de particules ne peut être obtenu que par les techniques du film et de la meringue.

L'autre facteur limitant a été la solubilité de la fisétine. Sa solubilisation n'a été possible que dans des solvants non protiques, comme le chloroforme, privilégiant également la méthode du film ou de la meringue comme méthode de préparation. Afin de réaliser une évaluation chez l'animal, il a été nécessaire de rendre les liposomes furtifs par ajout de lipide-PEG dans la préparation. Ces dérivés étant assez coûteux, des lipides-PEG synthétisés par les chimistes de notre unité ont été testés (Dr M. Bessodes), des études précédentes ayant montré qu'ils pouvaient être incorporés aussi efficacement que le PE-PEG (Phosphatidyl-éthanolamine-PEG) commercial, et induire une furtivité équivalente [Mignet *et al.*, 2007].

Nous avons testé différentes méthodes de préparation des liposomes fisétine. Le choix des lipides a été déterminé en fonction des caractéristiques physicochimiques des liposomes formés c'est-à-dire leur taille, leur index de polydispersité et de leur pourcentage d'encapsulation. La formulation optimale contient du PG90 (Phospholipon® 90 G) ou du DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), du DODA-PEG2000 (dioctadecyldiméthyl amino-PEG 2000), du

cholestérol et de la fisétine avec une proportion de 79,6/ 13,2/ 4/ 3,2 en pourcentage de poids respectif. Les liposomes formés présentent un diamètre hydrodynamique de 175 nm, un index de polydispersité de 0,12 et un taux d'encapsulation de 73 % (par rapport à la quantité de fisétine introduite initialement dans la préparation). Les liposomes préparés par la méthode du film sont stables en termes de taille pendant 59 jours, et le principe actif est majoritairement maintenu en suspension 32 jours après la préparation. De plus cette formulation conserve une activité cytotoxique tout comme la fisétine libre et induit un effet sur la morphologie des cellules endothéliales. Cette étude a donc permis d'obtenir une formulation utilisable pour l'administration systémique permettant d'encapsuler un principe actif lipophile avec un fort taux d'encapsulation tout en conservant ses propriétés biologiques. Ce travail a été publié récemment dans *International Journal of Pharmaceutics* et est présenté ci-après.

2. Article 4 : Validation de la forme liposomale *in vitro* et *in vivo*

En ce qui concerne la deuxième étude, nous avons évalué *in vitro* et *in vivo* la formulation optimale de la fisétine développée précédemment. Au cours des études cellulaires, une internalisation de la forme liposomale de la fisétine par les cellules de carcinome pulmonaire de Lewis a été observée. Cette internalisation a été accompagnée par une différence de morphologie des cellules LLC induite par la fisétine encapsulée au sein des liposomes, car les liposomes vides n'induisaient pas cet effet morphologique. De plus, lors de l'incubation de cette formulation avec les cellules LLC, une augmentation de la fraction sub-G1 a été observée par rapport aux cellules incubées en présence de liposomes vides. Cette augmentation indique un passage des cellules en phase apoptique lors du traitement par la fisétine liposomale.

En terme pharmacocinétique, la forme liposomale a permis une augmentation de la biodisponibilité relative d'un facteur 55 par rapport à celle de la fisétine non formulée.

L'encapsulation de la fisétine a été favorable en terme d'activité antitumorale, car une dose 10 fois plus faible de la fisétine sous forme liposomale a permis l'obtention d'un délai de croissance de 3,3 jours sur un modèle de tumeur LLC implanté en ectopique, alors que la fisétine libre n'a montré aucun effet à cette dose.

Une optimisation du traitement a également été réalisée en combinant la fisétine liposomale avec le cyclophosphamide. Cette association a permis

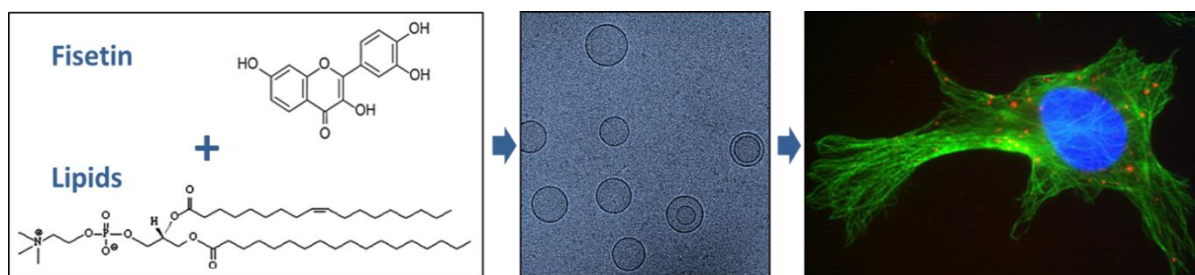
d'augmenter de 4,2 jours (cyclophosphamide seul) à 7,2 jours (cyclophosphamide + liposome fisétine). Ce gain thérapeutique de trois jours est considéré comme très significatif dans la tumeur LLC, particulièrement difficile à traiter en raison de métastases pulmonaires qui compliquent le traitement. Ce travail a été soumis pour publication à Journal of Controlled Release et est présenté ci-après.

IV. DEVELOPMENT OF A LIPOSOMAL FORMULATION OF THE NATURAL FLAVONOID Fisetin

Nathalie Mignet*, Johanne Seguin, Miriam Ramos Romano, Laura Brullé, Yasmine S. Touil, Daniel Scherman, Michel Bessodes, Guy G. Chabot*

Paris Descartes University; Faculty of Pharmacy; INSERM U1022; CNRS UMR8151; Sorbonne Paris Cité; Chimie ParisTech; Chemical, Genetic & Imaging Pharmacology Laboratory, F-75006 Paris, France

Int J Pharm. 2012 Feb 14;423(1):69-76



Development and optimization of a fisetin liposomal formulation that retains cytotoxic and morphological effects of free fisetin on endothelial cells.

Abstract

The natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) has been shown to possess antiangiogenic and anticancer properties. Because of the limited water solubility of fisetin, our aim was to design and optimize a liposomal formulation that could facilitate its *in vivo* administration, taking into account the availability and cost of the various components. Several methods were evaluated such as probe sonication, homogeneization, film hydration and lipid cake formation. A selection of lipid and lipid-PEG was also performed via their incorporation in different formulations based on the size of the liposomes, their polydispersity index (PDI) and the fisetin encapsulation yield. An optimal liposomal formulation was developed with P90G and DODA-PEG₂₀₀₀, possessing a diameter in the nanometer scale (175 nm), a high homogeneity (PDI 0.12) and a high fisetin encapsulation (73%). Fisetin liposomes were stable over 59 days for their particle diameter and still retained 80% of their original fisetin content on day 32. Moreover, liposomal fisetin retained the cytotoxicity and typical morphological effect of free fisetin in different tumour and endothelial cell lines. In conclusion, based on its physico-chemical properties and retention of fisetin biological effects, the developed liposomal fisetin preparation is therefore suitable for *in vivo* administration.

Keywords: Liposomes, Liposome optimization, Fisetin, Flavonoid, Cytotoxicity

1. Introduction

Several edible plant-derived compounds have been linked to the chemoprevention and treatment of cancer (Surh, 2003). Among these natural compounds, the flavonoids have shown several pharmacological properties of interest in the prevention and treatment of cancer (Havsteen, 2002; Lopez-Lazaro, 2002; Middleton, Jr. et al., 2000).

In a program aimed at finding novel antiangiogenic agents, we have recently identified the natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) as an interesting lead that can stabilize endothelial cells *in vitro* at non cytotoxic concentrations (Touil et al., 2009). Fisetin is present in several fruits, vegetables, nuts and wine (Arai et al., 2000; Kimira et al., 1998), and displays a variety of biological effects including antioxidant, anti-inflammatory (Park et al., 2007; Woodman and Chan, 2004), anti-carcinogenic and *in vitro* angiogenesis (Fotsis et al., 1997). Fisetin has been shown to inhibit several molecular targets, including cyclin-dependent kinases (Lu et al., 2005a; Lu et al., 2005b; Sung et al., 2007), DNA topoisomerases I and II (Constantinou et al., 1995; Olaharski et al., 2005), urokinase (Jankun et al., 2006), actin polymerization (Böhl et al., 2007), and androgen receptor signalling (Khan et al., 2008a).

Although fisetin has recently been shown to possess interesting anticancer activity *in vivo* in mice bearing lung carcinoma (Touil et al., 2010) and prostate tumours (Khan et al., 2008a), its *in vivo* administration remains problematic due to the relative water insolubility of this compound (Guzzo et al., 2006). To facilitate its *in vivo* administration, we therefore chose to formulate fisetin into liposomes and to evaluate if the new formulation retains the biological properties of fisetin.

Liposomes are artificial vesicles, composed of lipidic amphiphiles, usually phospholipids, which organise themselves in water to form an aqueous core surrounded by a lipidic bilayer. This structure allows liposomes to transport both hydrophilic and lipophilic compounds and have led to their clinical use as drug carriers of several drug classes including antibiotics, antifungals and anticancer agents (Allen and Cullis, 2004; Langer, 1998).

Concerning the anticancer agents, liposomes have been shown to allow a higher tumour accumulation of the drug (Gabizon, 1992). This tumour retention effect is apparently due to the liposomal drug extravasation through the tumour porous capillary endothelium, which appears to be a consequence of the rapid angiogenesis

occurring in tumours and not in normal tissues (Yuan et al., 1995). Several liposomal forms of anthracyclines are currently employed in the clinic and these formulations have contributed to significantly reduce toxicity while maintaining their anticancer activity in breast (Batist *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2004) and soft tissue carcinoma (Siehl *et al.*, 2005).

Hydrophobic compounds like flavonoids are not frequently formulated as liposomes, because a rapid exchange of the compounds may occur between the liposomal membrane and the cellular membrane (Fahr et al., 2006). However, this pharmaceutical formulation has recently been shown to improve the solubility of the flavonoid quercetin while maintaining its cytotoxicity *in vitro*, increase its blood residence time and its *in vivo* anticancer activity in mice (Yuan et al., 2006).

In the present study, our aim was therefore to develop and optimize a liposomal formulation of the flavonoid fisetin to facilitate its *in vivo* administration. We report here the different steps investigated to efficiently and easily encapsulate fisetin, while reducing the costs of the preparation by the assessment of the lipid/fisetin ratio, the choice of the liposomal method of preparation, and the excipient composition. Stability and *in vitro* cytotoxicity studies are also presented.

2. Experimental methods

2.1 Chemicals

Fisetin, cholesterol, DMSO, Hepes and phosphate buffers have been purchased at Sigma-Aldrich. Phospholipids such as dioleoyl-phosphatidylcholine, distearylphosphatidylethanolamine-poly(ethyleneglycol)₂₀₀₀ have been purchased from Aventi-Polar, Inc., and P90G has been obtained from Lipoid. Dichloromethane, triethylamine, chloroform, methanol, absolute ethanol and silica gel were provided by Carlo Erba Reactif, SDS. BOP was purchased at Advanced ChemTech. CHOL-PEG₂₀₀₀(OH) was synthesized as previously described (Masson *et al.*, 2004) and DODA-GLY-PEG₂₀₀₀ has been synthesized as described below in section 2.2.

2.2 Synthesis of DODA-GLY-PEG2000 (2-dioctadecylcarbamoyl-methoxyacetyl amino) acetic acid-(□-methoxy)-polyethylene glycol 2000 ester)

mPEG₂₀₀₀ glycine and DODA glycolic acid were obtained as described (Bhat *et al.*, 2007; Huetz *et al.*, 1997). DODA glycolic acid (1.41 g; 2.2 mmol) and mPEG-glycine (4.82 g; 2.2 mmol) were dissolved in dichloromethane (100 mL), triethylamine

(1.55 mL; 11 mmol) and BOP (0.98 g; 2.2 mmol) were added and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was concentrated and the residue chromatographed on silica gel eluted with dichloromethane/methanol (95/5 % v/v). The DODA-GLY-PEG₂₀₀₀ was obtained after evaporation of the solvent and crystallized in 2-propanol (3.18 g; 54 %). mp: 49.2°C; ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8.15 (s, 1H, N-H); 4.28 (m, 4H, CH₂); 4.15 (m, 2H, CH₂); 4.09 (m, 2H, CH₂); 3.64 (m, 180H, CH₂); 3.37 (s, 3H, CH₃); 3.28 (m, 2H, CH₂-N); 3.08 (m, 2H, CH₂-N); 1.51 (m, 4H, CH₂); 1.25 (m, 60H, CH₂); 0.87 (t, 6H, CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 170.29; 169.35; 168.18; 71.58; 70.02; 68.67; 64.15; 58.81; 31.74; 29.50; 29.17; 22.50; 13.98; m/z 2669.8.

2.3 Solubility tests

Increasing amount of fisetin was mixed in different solvents. Solubilisation value is given for solutions where a plateau was reached as determined by reading the absorbance at 340 nm by UV spectrophotometry. Fisetin solubility was found to be 4.35 mg/mL in ethanol, 4.65 mg/mL in methanol and 9.75 mg/mL in a mixture methanol/chloroform (50/50 % v/v).

2.4 Liposome preparation

○ *Probe sonication method.*

The aim of this method was to directly obtain an acceptable liposome size by avoiding the extrusion process. Components (600 mg total lipids) were weighed and added directly in Hepes buffer (15 mL, 20 mM; pH 7.4) which were then submitted to discontinuous sonication for 2 to 5 cycles (duty cycle of 90%) with a Branson Sonifier 450 (Danbury, US) displaying an output power of 400 Watts. A disrupter horn of 6 mm adapted to the 15 mL volume was used and the flask was plunged into ice to avoid aggregation. Liposome diameter and polydispersity index (PDI) were determined after each cycle. The data reported in Table 3 correspond to the best result obtained after 2 cycles.

○ *Homogeneization method.*

The aim of this method was to obtain directly an acceptable liposome size by avoiding the extrusion process. Components (600 mg total lipids) were weighed and added directly in Hepes buffer (20 mM; pH 7.4) at a concentration of 40 mg/mL,

which were then submitted to homogeneization during 1 to 50 min at different speeds (6500 to 9500 rpm) with an UltraTurrax T25 (IKA, Staufen, Germany), while keeping the flask into ice. Liposome size and PDI were determined on fractions harvested every 2 min and the data presented in Table 3 correspond to the results obtained after 20 minutes because there was no change beyond that time.

- *Film hydration method.*

Fisetin (12 mg, 42 μ mol), lipids with the ratio indicated in Table 1 (365 mg, 438 μ mol) and organic solvent (9 mL) were introduced into a clean and dry round-bottom flask. Solvent evaporation was performed on a Buchi evaporator (Buchi, Switzerland), equipped with a diaphragm pump (vacuubrand, Germany) and a cooler immersion (Tc40e, Huber), at decreasing pressure starting from 200 mBar to 100 mBar at room temperature to form a regular film on the bottom of the flask, then reducing the pressure by steps of 20 mbar every 10 minutes to reach 6 mbar which was maintained during 5 hours. The hydration process was then carried on for 24 h with Hepes buffer at room temperature (15 mL, 20 mM; pH 7.4), followed by successive extrusion on 0.8, 0.4 and 0.2 μ m membranes under nitrogen pressure (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada). Finally, the liposomes were purified by passage on a Sephadex G-25 column. Liposome size and PDI were determined as described below.

- *Lipid cake formation method.*

Fisetin (12 mg, 42 μ mol), organic solvent (9 mL), and lipids (365 mg, 438 μ mol) were both introduced in a clean and dry 500 mL cuve equipped with a magnetic stirrer. Solvent evaporation was performed on a Buchi evaporator (Buchi, Switzerland), equipped with a diaphragm pump (vacuubrand, Germany) with magnetic stirring during 3 h until a dry extract was obtained. The hydration process was then carried on for 6 h at room temperature with Hepes buffer (15 mL, 20 mM; pH 7.4) under stirring conditions. Liposomes were then extruded successively on 0.8, 0.4 and 0.2 μ m membranes, under nitrogen pressure (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) and finally purified on a Sephadex G-25 column. Liposome size and PDI were determined as described below.

2.5 Fisetin liposomal formulations tested

Constituents	1	2	3	4	5	6	7	8
DOPC	79.5	78	74	79.6		79.6		
P90G					79.6		79.6	79.6
Cholesterol	6	6	6	4	4	4	4	4
DSPE-PEG ₂₀₀₀	13	13	13	13.2	13.2			
Chol-PEG ₂₀₀₀ -OH						13.2	13.2	
DODA-GLY-PEG ₂₀₀₀								13.2
Fisetin	1.5	3	6	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2

Table 1. Proportions of the liposomal components used in the various formulations tested (% weight).

2.6 Determination of the liposome size by dynamic light scattering

Dynamic light scattering measures the motion of particles in a medium of known viscosity and refractive index. The Stokes-Einstein equation ($D = kT/6\pi R\eta$ where D is the particle scattering coefficient, T the temperature, K the Boltzmann constant R the particle radius and η the viscosity of the solvent) links the correlation function to the hydrodynamic radius allowing to access to the hydrodynamic particle diameter. Particle diameter was determined by dynamic light scattering on a Zeta Sizer NanoSeries Malvern (Malvern Instruments, Venissieux, France). The concentration of the samples was approximately 0.5 mg/mL in Hepes buffer. PDI reflects the polydispersity of the suspension ranging from 0 to 1, with the lower values indicating a more monodispersed suspension. Measurements have been performed in triplicate before and after purification. Ten measures have been performed at each time point for the evaluation of the colloidal stability.

2.7 Determination of fisetin encapsulation

The encapsulation yield has been determined according to the following formula:

Percent encapsulation (% w/w) = (Encapsulated fisetin concentration / total amount of fisetin in the formulation) $\times$ 100. The total amount of fisetin in the formulation was determined before purification. The concentration of encapsulated fisetin was evaluated after separation of liposomal and free fisetin on a Sephadex G-25 column, by two different methods, high-performance liquid chromatography (described hereafter in paragraph 2.7.1) and UV spectrophotometry which was

optimised in 96 well plates for the stability studies. All data were double checked by the two methods, with the exception of the stability studies performed by UV spectrophotometry. The amount of fisetin (mg) per total lipid amount (g) is also given in Tables 2 and 4.

○ *High performance liquid chromatography*

Liposomes were diluted (1/100) in methanol, vortexed, and 100 µL were injected onto a reversed-phase HPLC system (Shimadzu CLASS-VP®, version 5.3), equipped with an octadecylsilane column (Beckman Ultrasphere ODS, 5 µm; 4.6 × 250 mm) thermostated at 20°C, and a UV detector set at 360 nm. The mobile phase was composed of 52% methanol and 48% acidified water (2% v/v glacial acetic acid), at a flow rate of 1 mL/min. In these conditions the retention time of fisetin was 6.6 min and the calibration curve was linear with R^2 near unity (0.9972) with the following equation $y = 206196x$, where the slope is expressed in $\mu V \times \text{sec}$.

○ *Determination of fisetin encapsulation by UV spectrophotometry*

A calibration curve was prepared with a range of fisetin concentrations from 10 to 100 µg/mL in methanol. Purified liposomes were diluted 100 times in methanol to dissolve lipids and fisetin. All samples were loaded on a 96-well plate and absorbance values were read at 340 nm on a Berthold spectrophotometer. The amount of fisetin prior and post liposome purification was calculated according to the calibration curve, with the following equation $y = 0.232x - 0.0075$, $R^2 = 0.9975$.

2.8 Stability studies

Liposomal fisetin suspensions were stored at 4°C and samples were regularly withdrawn to perform size measurements as described in paragraph 2.6 and fisetin encapsulation assessment as described in paragraph 2.7. Percentage of fisetin release was calculated using the following formula: % fisetin release = $100 - (\text{encapsulated fisetin concentration} / \text{fisetin concentration in the liposome at the beginning of the stability study}) \times 100$.

2.9 Cytotoxicity tests

The murine Lewis lung carcinoma cell line (LLC) and the colon 26 (C26) carcinoma cell line were purchased from the American Type Culture Collection

(ATCC). The human endothelial cell line (EAhy 926) was obtained from Dr. Edgell (Edgell *et al.*, 1983) and used with permission. The cell lines were grown in DMEM containing 2 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (37°C, 5% CO₂). Cells were plated onto 96-well plates at 5000 cells per well in 100 µL of culture medium. Twenty-four hours after plating, 100 µL of medium containing the compound of interest (final concentrations ranging from 100 µg/mL to 0.8 µg/mL, in 2-fold dilutions) was added to the wells (in triplicate) containing the cells and incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂. After the 48 h exposure period to the test compounds, cell viability was evaluated using the MTT test and absorbance was read at 562 nm in a microplate reader (BioKinetics Reader, EL340). Results are expressed in percent of viability compared to the same concentration of solvent (DMSO for the fisetin, and empty liposomes for the fisetin liposome).

2.10 Electron microscopy

○ *Transmission Electron Microscopy*

Liposomal fisetin prepared as described were loaded on a Formvar/carbon copper grid 200 mesh from Agar Scientific. Uranyl acetate was used to stain the samples. Analyses were performed on a microscope JEOL, JEM 100S.

○ *Cryo Electron Microscopy*

Liposomal fisetin prepared as described were loaded on a Formvar/carbon copper grid 200 mesh (Quantifoil®). After a quick blotting with a filter paper, the grid is immersed in liquid ethane to vitrify the suspension. The grid was then transferred in a microscope JEOL 2100, equipped with a CRYO objective under the cryotransfer station Gatan 626 maintained in liquid nitrogen. Observations were performed at -180°C, images were registered in phase contrast at minimal electron dose (10 electrons per Å² per sec), and at ×40,000 magnification with a Gatan Ultrascan 1000 CCD camera.

2.11 Immunofluorescence Microscopy

EAhy 926 endothelial cells were plated on a 24 well plate (150 000 cells/mL) and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was discarded and liposomal fisetin (200 µL, 11 mg/mL with 1% of DOPE-rhodamine) or

free fisetin were added for 2 h at 37°C onto the cells. The cells were fixed (4% paraformaldehyde), permeabilized, and saturated with a 3% BSA solution containing 1% Triton $\times 100$ (1 h at room temperature). Cells were processed for indirect immunofluorescence as follows: cells were incubated 1 h at 37°C with the mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (Sigma) at 1/2000 dilution and further incubated with an anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody (Sigma) at 1/400 dilution for 45 min in the dark at room temperature. Photographs were taken on a Zeiss fluorescence microscope and a Zeiss LSM-510 confocal microscope (FITC: excitation 488 nm, emission 530 nm; DOPE-rhodamine: excitation 541 nm, emission 572 nm) (Carl Zeiss France, Le Pecq, France).

3. Results and Discussion

3.1 Determination of the maximum amount of fisetin inserted in the lipid bilayer

Fisetin is a lipophilic compound that solubilises into the lipidic bilayer because its log P octanol-water is estimated to be about 3.2 (Miteva *et al.*, 2006). We initially evaluated the interaction of fisetin with dimyristoylphosphatidylcholine as solubilizer (Guharay *et al.*, 2001), then evolved to more sophisticated liposome formulation to increase fisetin stability into the bilayer. Obviously, inserting a too large amount of fisetin would induce a destabilisation of the bilayer, therefore reducing the encapsulation yield. We first evaluated the maximal amount to be inserted into the lipid bilayer by increasing the amount of fisetin (1.5 to 6%, w/w) in a DOPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀-based liposome by using the film hydration method (**Table 1**) (Fattal *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1979). Thereafter, we evaluated the size and observed the aspect of the liposomes by transmission electron microscopy (TEM).

Preparation No.	DOPC/DSPE-PEG2000/Chol/Fisetin	Diameter (nm)	Peaks (nm)		PDI	% (w/w)	Fisetin /lipid (mg/g)
1	79.5 / 13 / 6 / 1.5	148	57	170	0.32	35	7
2	78 / 13 / 6 / 3	125	35	127	0.35	62	15
3	74 / 13 / 6 / 6	330	45	260	0.43	54	11

Table 2: Characteristics of liposomal fisetin preparations 1-3.

Components are expressed in weight for 100 mg of powder. The diameter was determined by dynamic light scattering (DLS). Diameter (nm) of the two populations is indicated. PDI, polydispersity index, represents the homogeneity of the

preparation. % (w/w) represents the percentage of fisetin encapsulated versus fisetin in the formulation. The ratio fisetin per total lipid is expressed in mg/g.

As can be seen from the data in **Table 2**, the liposome size and the polydispersity index (PDI) increased with the amount of fisetin introduced in the preparation. A possible explanation to the increased PDI would be that the insertion of fisetin in the bilayer could reduce the lipid cohesion leading to polydispersed preparations. As a matter of fact, microscopic observations indeed showed that preparations 1 and 2 were homogeneous (Figure 1- A and B). The insertion of higher amount of fisetin in preparation 3 resulted in an increased liposome size and exclusion of the lipid components from the liposomes, as observed in Figure 1-C. These results are compatible with dynamic light scattering data presented in Table 1 which indicate a high diameter value of 330 nm. Consequently, due to its high PDI and diameter values, preparation 3 was not considered further.

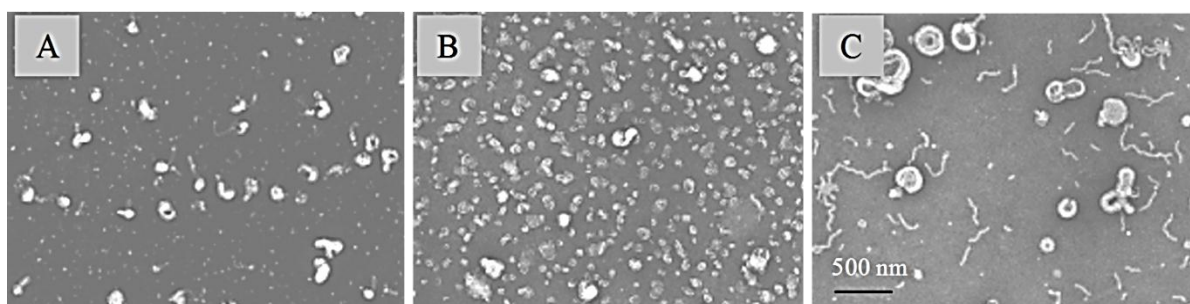


Figure 1. Transmission electron microscopy photographs depicting formulations 1, 2, and 3, labeled as A, B, and C, respectively (original magnification X 30000).

The choice between formulation 1 or 2 was based on the fisetin encapsulation yield. Formulation 2 gave a 62% fisetin encapsulation compared to preparation 1 which presented only a 35% encapsulation value, by taking into account the initial amount of fisetin involved in the preparation, or 15 versus 7 mg fisetin/g total lipid respectively (Table 2). Preparation 2 was therefore chosen for further optimization, as described hereafter.

3.2 Liposomal fisetin optimization

Preclinical *in vivo* tests in mice require a higher liposomal volume than the ones usually required for *in vitro* testing. Those larger volumes also involved increased costs and hampered the formulation process, leading to irreproducible batches. We therefore aimed at improving the fisetin liposomal preparation by changing the various components and optimize the process as described below.

3.3 Choice of the method for optimization of formulation 2

Several methods have been reported to prepare liposomes. In a research laboratory scale, the two main methods used for liposomal preparation are ethanol injection and film formation (New, 1990). Although the ethanol injection method appears to be the least expensive (Rodriguez and Moraes, 2010) and easy to perform (Thompson *et al.*, 2005), injection of an ethanolic solution of fisetin and lipids in an aqueous medium induced precipitation of the flavonoid, due to its poor ethanol solubility.

Consequently, the film formation method was chosen to encapsulate fisetin. Liposome preparation by film formation involves three steps: film formation, hydration and size reduction. Of those steps, homogeneity of the film and volume of hydration appear difficult to scale-up. Thus, to avoid the film formation step, we evaluated a similar technique of solvent evaporation to dryness, in order to form a dry extract (lipid cake), followed by hydration and size reduction. Lipid cake formation consisted of simply drying the lipids under vacuum with constant stirring. To avoid the problems inherent to the film formation method, we also evaluated ultrasound-based sonication and homogeneization, because they advantageously avoid organic solvent use (Brandl *et al.*, 1990). A comparison of the four techniques employed to prepare liposomal fisetin are presented in Table 3.

Methods	Solvent	Diameter (nm)	PDI	% Fis encaps Purif./non purif.	Observations
Probe sonication	-	300	0.51	ND	Non homogeneous
Homogeneization	-	1000	0.96	ND	Non homogeneous
Film hydration	+	140	0.13	56	Film adequate
Lipid cake formation	+	170	0.08	55	Highly viscous foam formed

Table 3: Comparison of different methods of liposomal fisetin preparation.

The values presented are for a batch of 50 mM of total lipid. PDI is the polydispersity index. Percent encapsulation is the percentage of encapsulation, as compared to the amount of fisetin initially weighed. ND, not determined because of high polydispersity.

The probe sonication and homogeneization methods were attractive because they did not require solvent use (**Table 3**). We have worked on different conditions in order to optimize the liposome preparation, taking into account the volume, the temperature, the output power applied and the duration of the process application, as

described in the experimental part. For ultrasound application, liposome size and PDI were measured after each cycle in order to determine the evolution of the liposomes under the conditions used. As for the homogeneization process, liposome size and PDI were determined every two minutes. Despite the efforts to optimize the methods on the fisetin liposomal formulation, these two methods did not yield homogeneous preparations and fisetin aggregates were observable. It thus appears that the 3 steps are required for liposomal fisetin preparation, i.e., film formation, hydration and size reduction.

For the two other methods (film hydration and lipid cake formation), only the first step differed. Either a lipid film was formed by evaporation under slight rotation and controlled reduced pressure, or a lipid cake was formed under reduced pressure, stirring the lipids with fisetin. In this last process, the consistence of the dry extract formed and its apparent inhomogeneous hydration did not appear to be a controlled process, but it nonetheless allowed obtaining highly homogeneous liposomes after extrusion (PDI=0.08), as shown in Table 3. This lipid cake formation process was therefore chosen for the following optimization experiments.

3.4 Optimization of the liposomal formulation

Liposomes prepared with the above synthetic phospholipids of very high quality were relatively expensive. To reduce these costs, we decided to replace the lipid and lipid-PEG components. The 99% pure DOPC was replaced by another phosphatidylcholine P90G of slightly lower purity (94%) which is approved by the FDA in pharmaceutical formulations. The DSPE-PEG₂₀₀₀ was replaced by different lipid-PEG of the same PEG length differing by their lipid moiety. Thus, distearoyl-phosphatidylethanolamine (DSPE) which is mainly responsible for the high cost of this lipid, was replaced by a cholesterol or a dioctadecyl-glycine (DODA-GLY) moiety. The ratios of the different components, based on the previous results, are presented in **Table 1**.

Five fisetin liposomal formulations (reported in Table 4) were all prepared following the above described lipid cake formation protocol. In these experiments, the scale was based on a lipid concentration of 100 mM and a final volume of 100 mL. No practical difficulties have been encountered with the newly tested components. The size of the unpurified and purified steps, and percent encapsulation of the new liposomal formulations were assessed and are presented in **Table 4**.

Preparation number	Composition	Unpurified Diameter (nm)	PDI	Purified Diameter (nm)	PDI	Fis encaps (%)	Ratio Fis/lipid (mg/g)
4	DOPC DSPE-PEG	260	0.35	190	0.15	52	12
5	P90G DSPE-PEG	330	0.36	300	0.28	44	9
6	DOPC Chol-PEG	180	0.26	155	0.17	47	10
7	P90G Chol-PEG	145	0.26	140	0.13	30	6
8	P90G DODA-PEG	195	0.16	175	0.12	73	18

Table 4: Diameter (nm) and polydispersity index (PDI) of fisetin liposomal formulations 4 to 8 before and post purification by size exclusion chromatography. Values given correspond to the means within a range of 1.5%.

Because changes in the liposome composition can affect liposome properties (Khan *et al.*, 2008b), we then evaluated the characteristics of the new formulations to choose the alternative components. Replacing DOPC by P90G did not improve liposome homogeneity or percent encapsulation by considering samples 4 and 5 (Table 4). However, in presence of Chol-PEG₂₀₀₀-OH (samples 6 and 7) instead of DSPE-PEG₂₀₀₀ (samples 4 and 5), this modification appeared advantageous for both DOPC and P90G lipids in terms of liposome size, but the percent encapsulation was reduced. Because fisetin is solubilized in the lipid bilayer, we inferred that a bicatenar lipid bearing PEG could better stabilize the bilayer compared to a cholesterol lipid bearing PEG. We therefore synthesized a DODA-GLY-PEG compound to evaluate if DSPE-PEG₂₀₀₀ could be replaced.

A straightforward synthesis of DODA-GLY-PEG was achieved by the BOP mediated condensation of the low cost and easily prepared mPEG-GLY-NH₂ (Bhat *et al.*, 2007) and DODA-glycolic acid (Huetz *et al.*, 1997). The choice of the linker between the PEG and the lipid was first based on previous studies showing higher stability of cationic lipoplexes by PEG-linker-lipids, compared to PEG-lipid, probably by a better exposition of the PEG outside the lipid bilayer (Nicolazzi *et al.*, 2003), and second for the biodegradability brought by the ester function in this particular linker. DODA-GLY-PEG was then inserted into formulation 8.

From the data in Table 4, preparation 8 exhibited the best characteristics in terms of polydispersity before (PDI= 0.16) and after column purification (PDI= 0.12). The liposome size and aspect was further characterized by cryo-transmission electronic microscopy. One representative image depicted in Figure 2 confirmed the homogeneity of the suspension and showed that the liposomes formed where mostly unilamellar vesicles with a mean diameter around 100 nm.

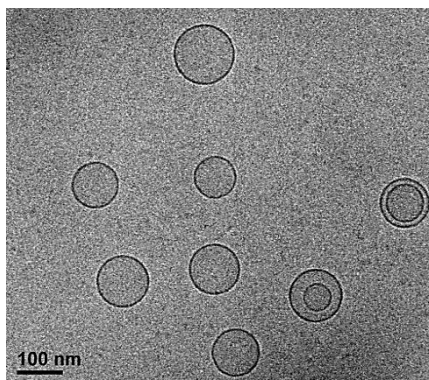


Figure 2. Representative photograph of liposomal fisetin formulation 8 obtained by Cryo Transmission Electron Microscopy.

Moreover, preparation 8 was also the best in terms of percent fisetin encapsulation (73%). Because it has previously been reported that there is a close relationship between flavonoid molecular structure and its interaction with model membranes (Goniotaki *et al.*, 2004), one can not exclude that the molecular structure of fisetin would interact differently with lipids of different nature, as seen in preparation 8. An alternative hypothesis for this important gain in percent encapsulation could be that the DODA moiety stabilises the lipid packing around the fisetin molecules.

This preparation has been repeated 6 times, the mean diameter of the liposome obtained was 169 ± 15 nm with a mean polydispersity of 0.141 ± 0.05 showing the reproducibility of this formulation. Fisetin liposomes formulation 8 was therefore chosen for the stability studies and cellular cytotoxicity tests.

3.5 Stability of the liposomal fisetin

Colloidal stability of the liposomal fisetin and fisetin release from the liposomes are two main parameters related to liposomal stability. These two parameters were evaluated over a period of time by following the evolution of the liposome diameter by dynamic light scattering and the fisetin encapsulation into the liposomes after purification of samples at each time point.

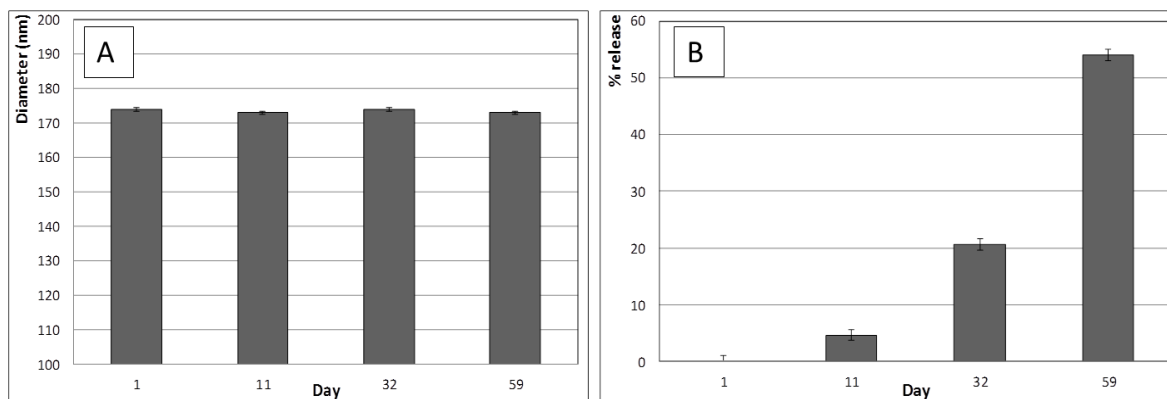


Figure 3. Fisetin liposome diameter (nm) (A) and fisetin release (%) (B) after storage at 4°C over a period of 59 days.

As presented in Figure 3-A, liposome size did not vary significantly over 59 days. Fisetin was released slowly from the liposomes leading to an encapsulation of 50% after 59 days which means that it was still usable after this time period (Figure 3-B). Those results indicated that fisetin liposomes were stable and injectable after 59 days and therefore could be used in tumour regression studies performed usually on a 15 day time schedule in tumour bearing animals. However, after 10 days, the dose should be adapted or a new batch should be prepared to avoid any risk of fisetin aggregation post injection. Lyophilized batches could also be evaluated if the *in vivo* experiments would need to be pursued for longer periods of time.

3.6 Cytotoxicity and cell morphology of liposomal fisetin

To evaluate if fisetin cytotoxicity was maintained when encapsulated into liposomes, viability tests were performed on three different cell lines including the endothelial EAhy 926 cells, and two cancer cell lines (Lewis lung carcinoma (LLC) and colon tumour 26 (C26)). The survival curve for LLC cells presented in Figure 4 shows that there was no difference between the free fisetin and the liposomal fisetin in the fisetin concentration required to kill 50% of cells (IC_{50}) which was 15.5 $\mu\text{g/mL}$ for the former and 15.0 $\mu\text{g/mL}$ for the latter. We also observed similar IC_{50} concentrations for the C26 colon cells (liposome=16.7 $\mu\text{g/mL}$; free 15.7 $\mu\text{g/mL}$) and EAhy 926 endothelial cells (liposome=17.9 $\mu\text{g/mL}$; free 17.3 $\mu\text{g/mL}$) (data not shown).

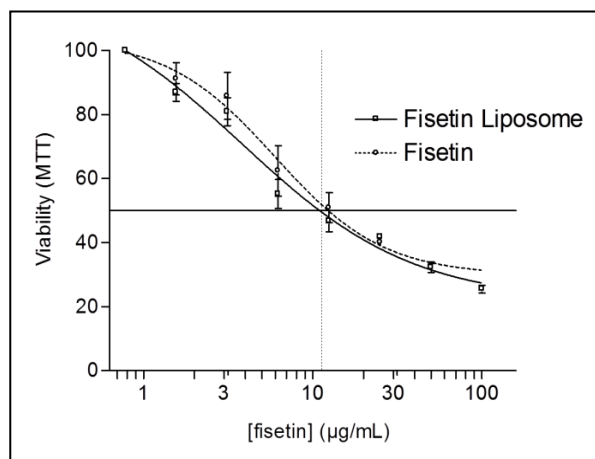


Figure 4. Comparison of the cytotoxicity of free fisetin with liposomal fisetin on Lewis lung carcinoma cells (LLC) after 48 hours exposure time.

Because fisetin has been reported to induce a typical morphological modification of endothelial cells (Touil *et al.*, 2009), we also evaluated the effect of liposomal fisetin on the morphology of endothelial cells during a short incubation time of 2 hours. As expected, free fisetin elicited the typical formation of pseudopodes (Figure 5-A). Liposomal fisetin could also cause the formation of pseudopodes as depicted in Figure 5-B, indicating that encapsulated fisetin retained the free fisetin activity on endothelial cell morphology. Also of note, liposomes were seen to be internalized, as shown by the presence of red dots inside the cells (Figure 5-B).

Therefore, the encapsulation of fisetin into liposomes was shown to retain its biological activities, as substantiated by similar cytotoxicity values compared to the free fisetin, and also by its morphological activity observed on endothelial cells. The fact that similar level of cytotoxicity and morphological effects were observed could indicate that fisetin is rapidly released from the liposomes post membrane interaction as already reported for other lipophilic compounds (Fahr *et al.*, 2006). We did not expect any improvement of the *in vitro* cytotoxicity at this point, eventually a reduced cytotoxicity if slow release would occur into the cells. However, for the *in vivo* situation, the liposomal fisetin formulation could be advantageous because it could prolong the residence time of this compound and allow for a better anticancer effect *in vivo*, as recently reported for another flavonoid (Yuan *et al.*, 2006).

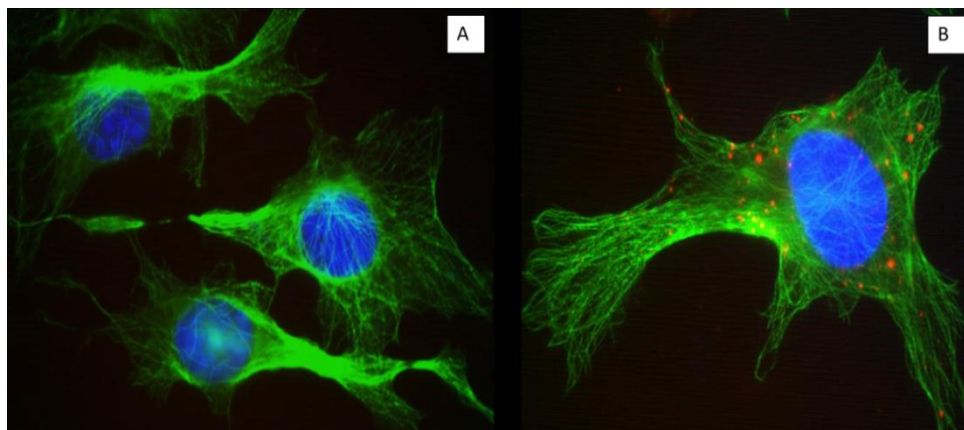


Figure 5. Representative photographs depicting endothelial cells (EAhy 926) treated with free fisetin at a concentration of 11 $\mu\text{g/mL}$ (A), and liposomal fisetin at 11 $\mu\text{g/mL}$ (B), for a 2 h incubation time. Green represents the tubulin and the red dots in B are the DOPE-rhodamine labeled liposomes.

In conclusion, we have developed and optimized a liposomal formulation of fisetin, for the first time to our knowledge, that was shown to retain the biological properties of free fisetin. Because few PEG-lipids are readily available and also because they are also expensive, we prepared DODA-GLY-PEG₂₀₀₀ which allowed the formation of highly homogeneous liposomes. In addition, substitution of DOPC by P90G lecithin and DSPE-PEG₂₀₀₀ by DODA-GLY-PEG₂₀₀₀ led to liposomal form of fisetin which solubilized fisetin and did not alter its biological properties. Based on these promising results, we plan to further test this liposomal fisetin preparation in tumour bearing mice to fully develop the antiangiogenic and anticancer activities of this natural flavonoid.

Acknowledgements

This research was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS and by a grant from the Institut National du Cancer (INCa, Boulogne-Billancourt, France). We also thank René Lai-Kuen and Bruno Saubamea from Technical Platform of the IFR71/IMTCE – Cellular & Molecular Imaging – Faculty of Pharmacy – Paris Descartes University, and Eric Larquet from the IMPMC, CNRS-UMR7590, Université Pierre & Marie Curie, for the cryoelectronic transmission microscopy expertise and experiments.

References

- Allen, T.M., Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303, 1818-1822.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N., 2000. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.*, 130, 2243-2250.
- Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C.S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Shah, P., Khojasteh, A., Nair, M.K., Hoelzer, K., Tkaczuk, K., Park, Y.C., Lee, L.W., 2001. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19, 1444-1454.
- Bhat, B.A., Shafi, S., Purnima, B., Banday, A.H., Kumar, H.M.S., 2007. Ferrier rearrangement for the synthesis of PEG-bound 2,3-unsaturated glycopyranosyl-amino acids. *Tetrahedron Letters*, 48, 1041-1043.
- Böhl, M., Tietze, S., Sokoll, A., Madathil, S., Pfennig, F., Apostolakis, J., Fahmy, K., Gutzeit, H.O., 2007. Flavonoids affect actin functions in cytoplasm and nucleus. *Biophys. J.*, 93, 2767-2780.
- Brandl, M., Bachmann, D., Drechsler, M., Bauer, K., 1990. Liposome preparation by a new high pressure homogenizer gaulin Mlicron Lab 40. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 16, 2167-2191.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A., Moon, R., 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 58, 217-225.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 3734-3737.
- Fahr, A., van, H.P., Kuntsche, J., Leigh, M.L., 2006. Lipophilic drug transfer between liposomal and biological membranes: what does it mean for parenteral and oral drug delivery? *J. Liposome Res.*, 16, 281-301.
- Fattal, E., Couvreur, P., Puisieux, F., 1993. Méthodes de préparation des liposomes, in: Delattre, J., Couvreur, P., Puisieux, F., Philippot, J.-R., Schuber, F. (Eds.), *Les liposomes-Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Les Editions INSERM, Paris, France, 43-62.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.*, 57, 2916-2921.
- Gabizon, A.A., 1992. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res.*, 52, 891-896.
- Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., Demetzos, C., 2004. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, 1217-1224.
- Guharay, J., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2001. Protein-flavonol interaction: fluorescence spectroscopic study. *Proteins*, 43, 75-81.
- Guzzo, M.R., Uemi, M., Donate, P.M., Nikolaou, S., Machado, A.E., Okano, L.T., 2006. Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A*, 110, 10545-10551.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96, 67-202.

- Huetz, P., van Neuren, S., Ringler, P., Kremer, F., van Breemen, J.F.L., Wagenaar, A., Engbertz, J.B., Fraaije, J.G., Brisson, A., 1997. Relationship between molecular structure and supramolecular morphology of DODA-EO2-biotin and related lipids. *Chem. Phys. Lip.*, 89, 15-30.
- Jankun, J., Selman, S.H., Aniola, J., Skrzypczak-Jankun, E., 2006. Nutraceutical inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol. Rep.*, 16, 341-346.
- Khan, N., Asim, M., Afaq, F., Abu, Z.M., Mukhtar, H., 2008a. A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res.*, 68, 8555-8563.
- Khan, R., Rezler, E., Lauer-Fields, J., Fields, G., 2008b. Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. *Chem. Biol. Drug Des.*, 71, 3-7.
- Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K., Watanabe, S., 1998. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.*, 8, 168-175.
- Langer, R., 1998. Drug delivery and targeting. *Nature*, 392, 5-10.
- Lopez-Lazaro, M., 2002. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2, 691-714.
- Lu, H., Chang, D.J., Baratte, B., Meijer, L., Schulze-Gahmen, U., 2005a. Crystal structure of a human cyclin-dependent kinase 6 complex with a flavonol inhibitor, fisetin. *J. Med. Chem.*, 48, 737-743.
- Lu, X., Jung, J., Cho, H.J., Lim, D.Y., Lee, H.S., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H., 2005b. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.*, 135, 2884-2890.
- Masson, C., Garinot, M., Mignet, N., Wetzter, B., Mailhe, P., Scherman, D., Bessodes, M., 2004. pH-sensitive PEG lipids containing orthoester linkers: new potential tools for nonviral gene delivery. *J. Control Release*, 99, 423-434.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751.
- Miteva, M.A., Violas, S., Montes, M., Gomez, D., Tuffery, P., Villoutreix, B.O., 2006. FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Res.*, 34, W738-W744.
- New, R.R.C., 1990. Preparation of liposomes, in: New, R. R. C. (Ed.), *Liposomes-A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, 33-104.
- Nicolazzi, C., Mignet, N., de la, F.N., Cadet, M., Ibad, R.T., Seguin, J., Scherman, D., Bessodes, M., 2003. Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmatic circulation time. *J. Control Release*, 88, 429-443.
- O'Brien, M.E., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C., 2004. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.*, 15, 440-449.
- Olaharski, A.J., Mondrala, S.T., Eastmond, D.A., 2005. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582, 79-86.
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 9-23.
- Park, H.H., Lee, S., Oh, J.M., Lee, M.S., Yoon, K.H., Park, B.H., Kim, J.W., Song, H., Kim, S.H., 2007. Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacol. Res.*, 55, 31-37.

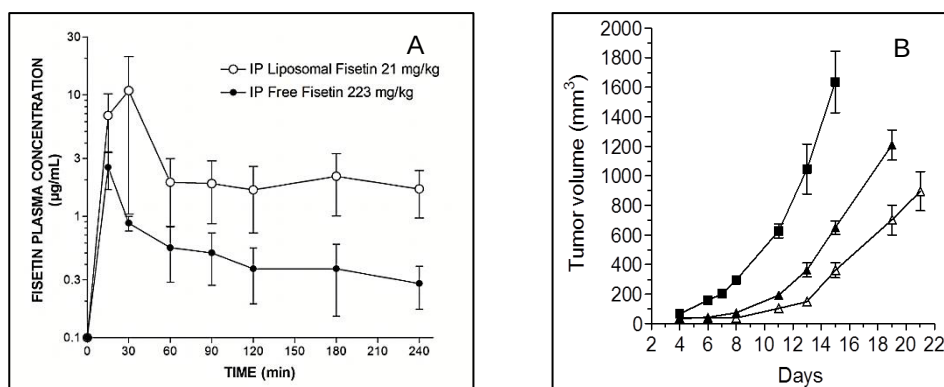
- Rodriguez, J.O., Moraes, A.M., 2010. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant. *Chem. Eng. Technol.*, 33, 15-20.
- Siehl, J.M., Thiel, E., Schmitt, A., Hutter, G., Deckert, P.M., Szelenyi, H., Keilholz, U., 2005. Ifosfamide/liposomal daunorubicin is a well tolerated and active first-line chemotherapy regimen in advanced soft tissue sarcoma: results of a phase II study. *Cancer*, 104, 611-617.
- Sung, B., Pandey, M.K., Aggarwal, B.B., 2007. Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkappaBalpha kinase activation. *Mol. Pharmacol.*, 71, 1703-1714.
- Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 768-780.
- Thompson, B., Mignet, N., Hofland, H., Lamons, D., Seguin, J., Nicolazzi, C., de la Figuera, N., Kuen, R.L., Meng, X.Y., Scherman, D., Bessodes, M., 2005. Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery. *Bioconjug. Chem.*, 16, 608-614.
- Touil, Y.S., Fellous, A., Scherman, D., Chabot, G.G., 2009. Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr. Cancer*, 61, 310-321.
- Touil, Y.S., Seguin, J., Scherman, D., Chabot, G.G., 2010. Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, DOI: 10.1007/s00280-010-1505-8, In Press.
- Woodman, O.L., Chan, E.C., 2004. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31, 786-790.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1995. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.*, 55, 3752-3756.
- Yuan, Z.P., Chen, L.J., Fan, L.Y., Tang, M.H., Yang, G.L., Yang, H.S., Du, X.B., Wang, G.Q., Yao, W.X., Zhao, Q.M., Ye, B., Wang, R., Diao, P., Zhang, W., Wu, H.B., Zhao, X., Wei, Y.Q., 2006. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin. Cancer Res.*, 12, 3193-3199.

V. LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF THE NATURAL FLAVONOID FISETIN IMPROVES BIOAVAILABILITY AND ANTITUMOR EFFICACY (ARTICLE 4)

Johanne SEGUIN, Laura BRULLÉ, Renaud BOYER, Yen Mei LU, Miriam RAMOS ROMANO, Yasmine S. TOUIL, Daniel SCHERMAN, Michel BESSODES, Nathalie MIGNET and Guy G. CHABOT*

Paris Descartes University; Faculty of Pharmacy; INSERM U1022; CNRS UMR8151; Sorbonne Paris Cité; Chimie ParisTech; Chemical, Genetic & Imaging Pharmacology Laboratory, F-75006 Paris, France

Soumis à Journal of Controlled Release



Liposomal formulation of fisetin improves its bioavailability (A) and antitumor efficacy in mice (B). Lewis lung carcinoma bearing mice treated with empty liposomes (solid squares), empty liposomes and cyclophosphamide at 30 mg/kg (solid triangles), and liposomal fisetin at 35 mg/kg in combination with cyclophosphamide at 30 mg/kg (empty triangles).

Abstract

The natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) has shown antiangiogenic and anticancer properties. Because of fisetin limited water solubility, our aim was to design a liposomal formulation and evaluate its biological properties *in vitro* and in Lewis lung carcinoma (LLC) bearing mice.

A liposomal formulation was developed with DOPC and DODA-PEG2000, possessing a diameter in the nanometer scale (173.5 ± 2.4 nm), a high homogeneity (polydispersity index 0.181 ± 0.016) and a high fisetin encapsulation (58%). Liposomal fisetin incubated with LLC cells could be internalized, induced a typical fisetin morphological effect and increased the sub-G1 cell distribution.

In vivo, liposomal fisetin allowed a 55-fold increase in relative bioavailability compared to free fisetin. The effect of the liposomal fisetin on LLC tumor growth in mice using a low fisetin dose of 21 mg/kg was excellent with a gain of 3.3 days in tumor growth delay compared to free fisetin that had not effect at this dose level. Optimization of the liposomal fisetin therapy was also attempted by co-treatment with cyclophosphamide which led to a significant improvement in tumor growth delay (7.2 days) compared to cyclophosphamide with control liposomes (4.2 days). This drug combination was not toxic, as shown by negligible body weight change in treated animals.

In conclusion, the developed fisetin liposomal formulation markedly improved fisetin bioavailability and anticancer efficacy in mice. Liposomal fisetin could therefore not only facilitate its *in vivo* administration, but could also help to translate the interesting antiangiogenic and anticancer properties of this molecule to the clinical setting.

Keywords: Flavonoid, fisetin, liposomes, pharmacokinetics, bioavailability, Lewis lung carcinoma, cyclophosphamide, cell cycle, anticancer effect.

Abbreviations used: DODA, dioctadecyldimethylammonium chloride; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPE-rhodamine, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-rhodamine; DSPE-PEG(2000), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]; GLY, glycine; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous; LLC, Lewis lung carcinoma; P90G, Phospholipon® 90 G; PDI, polydispersity index; PEG2000, poly(ethylene glycol)₄₅; SDS, sodium dodecyl sulphate.

1. Introduction

Numerous plant-derived compounds have been linked to the chemoprevention and treatment of cancer, including the flavonoids which occupy a central place due to their widespread abundance in human food and because they are relatively non-toxic [1-5]. As part of a research program aimed at finding new antiangiogenic agents in the flavonoid family, we have recently identified the natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) as an interesting lead that can stabilize endothelial cells *in vitro* at non-cytotoxic concentrations [6]. Fisetin is mainly found in fruits, vegetables, nuts and wine [7,8] and displays a variety of biological effects including antioxidant and anti-inflammatory [9,10]. Several studies have shown *in vitro* cytotoxic and apoptotic effect of fisetin [11-16]. Antiangiogenic properties of fisetin have also been documented *in vitro* and *in vivo* in mice [17-19].

Fisetin mechanism of action appears to be complex and involves the inhibition of several molecular targets and pathways, including cyclin-dependent kinases [20-22], DNA topoisomerases I and II [23,24], urokinase [25], actin polymerization [26], androgen receptor signaling [27], activation of p53 and inhibition of NFkB pathways [28].

Fisetin has recently been shown to possess interesting *in vivo* anticancer activity in mice bearing mouse lung carcinoma [19], human melanoma [14] and human prostate tumors [27]. Because fisetin has a low water solubility [29] and poor bioavailability [30], its *in vivo* administration remains a challenge. We therefore undertook to formulate fisetin into liposomes to hopefully improve its bioavailability and increase its antitumoral activity.

Liposomes are artificial vesicles composed of lipidic amphiphiles, usually phospholipids, which organize themselves in water to form an aqueous core surrounded by a lipidic bilayer. This structure allows liposomes to transport both hydrophilic and lipophilic compounds and have led to their clinical use as drug carriers of several drug classes including antibiotics, antifungals and anticancer agents [31,32]. Concerning the anticancer agents, liposomes have been shown to increase drug accumulation in tumors [33]. This tumor retention effect is apparently due to the liposomal drug extravasation through the tumor porous capillary endothelium [34]. Several liposomal forms of anthracyclines are currently being employed in the clinic and these formulations have contributed to significantly reduce toxicity while maintaining their anticancer activity in breast [35,36] and soft tissue carcinoma [37].

Hydrophobic compounds like flavonoids are not frequently formulated as liposomes, because a rapid exchange of the compounds may occur between the liposomal membrane and the cellular membrane [38]. However, this pharmaceutical formulation has recently been shown to improve the solubility of the flavonoid quercetin while maintaining its cytotoxicity *in vitro*, increase its blood residence time and anticancer activity in mice [39].

We have recently developed a liposomal formulation of fisetin that was shown to retain its biological activities *in vitro* [40]. The purpose of the present study was to determine the bioavailability of fisetin administered as a liposomal formulation, and to evaluate its anticancer effects in tumor bearing mice. We also studied the combination of the liposomal fisetin with the cytotoxic drug cyclophosphamide. Our results demonstrate that the liposomal formulation can markedly increase fisetin bioavailability and improve its anticancer activity in Lewis lung carcinoma bearing mice.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Fisetin (98% purity) was purchased from Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China). Cholesterol, DMSO, morin, cyclophosphamide, Hepes and phosphate buffers were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). DOPE-rhodamine was purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Coker, Paris, France). P90G was obtained from Lipoid (Steinhausen, Switzerland). Dichloromethane, triethylamine, chloroform, methanol, absolute ethanol and silica gel were provided by Carlo Erba Reactif, SDS (Peypin, France). BOP was purchased at Advanced ChemTech (Louisville, Kentucky, USA). DODA-GLY-PEG2000 has been synthesized as previously described [40]. All other chemicals were of pharmaceutical grade or of the highest analytical purity available.

2.2 Liposomal fisetin preparation

The liposomal fisetin was basically prepared according to our previously described preparation 8 [40], by replacing P90G by DOPC. Briefly, DOPC, cholesterol, DODA-PEG₂₀₀₀ and fisetin were mixed in chloroform : ethanol (10: 1, v: v), using the following weight ratio 79.6; 13.2; 4 and 3.2. The solution was evaporated under vacuum at 37°C during 5 h. Film hydration was then performed by

gently mixing the film overnight in Hepes buffer 10 mM and glucose 5% to reach a final lipid concentration of 100 mM. Lipid extrusion was carried out on a Lipex extruder (Biomembranes, Inc.) under nitrogen pressure in order to concentrate and homogenize the liposomal preparation. The sample was successively passed through several filters with porosity of 0.8 μ m and 0.4 μ m. Liposomal purification was accomplished on a Sephadex G-25 column conditioned with Hepes buffer glucose (10 mM, 5%, respectively pH 7.4) that allowed to eliminate free fisetin. The mean liposome diameter and the polydispersity index (PDI) were determined by diffusion light scattering (Malvern Zeta Sizer NanoSeries). The percent fisetin encapsulation was determined using the HPLC system described below and was calculated based on the amount initially incorporated in the preparation.

2.3 Effect of encapsulated fisetin on Lewis lung carcinoma cells (LLC)

Lewis lung carcinoma cells were plated on a 24 well plate (150 000 cells/mL) and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. The DMEM medium was discarded and liposomal fisetin (200 μ L, 11 mg/mL with 1% of DOPE-rhodamine) or free fisetin were added for 2 h at 37°C onto the cells. After incubation, the cells were fixed (4% paraformaldehyde), permeabilized, and saturated with a 3% BSA solution containing 1% Triton $\times$ 100 (1 h at room temperature). Cells were processed for indirect immunofluorescence as follows: cells were incubated 1 h at 37°C with the mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (Sigma) at 1/2000 dilution and further incubated with an anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody (Sigma) at 1/400 dilution for 45 min in the dark at room temperature. Photographs were taken on a Zeiss fluorescence microscope and a Zeiss LSM-510 confocal microscope (FITC: excitation 488 nm, emission 530 nm; Carl Zeiss France, Le Pecq, France).

2.4 Quantitative assessment of apoptosis and analysis of cell cycle

The tumor cell (LLC) were plated onto 6 well plate (200 000 cells/mL) and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were incubated thereafter with empty liposomes (0.24 mg/ml of lipids), liposomal fisetin (200 μ L, 11 mg/mL) or free fisetin for 24 h at 37°C. After this second incubation the supernatant was discarded and cells were trypsinized and put into 15 ml tubes and centrifuged for 5 min at 290 $\times$ g. The cells were washed tree times with phosphate buffer,

permeabilized with 80% ethanol during 30 min at 20°C, and incubated with a staining solution 30 min in the dark. The staining solution was composed of 50 µg/mL of propidium iodide, 50 µg/mL of RNase, 0.1% of triton X100 and 1 mg/mL of sodium citrate. After staining, the cells were analyzed on a Coulter Epics cytometer (lex 488 nm, lem 625 nm). The rate of cell in phase Sub-G1, G1, S and G2/M were determined using the WinMDI software. The cells in Sub-G1 phase were considered as apoptotic cells.

2.5 Fisetin pharmacokinetics in mice

○ *Mice and treatments*

Female 8 weeks old C57BL/6J mice (body weight 18-22 g), were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). After an overnight fasting period, mice were administered the various treatments as described hereafter. For the intravenous (i.v.) administration into the tail vein, 21 mice received the free fisetin formulated in 20% DMSO, 20% PEG 200 and 60% saline at a final concentration of 1.3 mg/mL (hereafter referred as “free fisetin”). The total volume injected i.v. was 200 µL for a 20 g mouse, which corresponds to a volume of DMSO of 40 µL. It should be noted that an undiluted DMSO volume of 50 µL can be administered safely i.v. to mice without toxicity [41], and that in our studies, the final DMSO dose per mouse corresponds to 40 µL (for a 20 g mouse), which was further diluted in saline and injected slowly over 1 minute. We did not encounter any acute mortality using this formulation in our studies. A second group of 21 mice received the i.v. fisetin liposomes sterilized by filtration through 0.22 µm filters at 13 mg/kg. Mice were sacrificed at 5, 10, 15, 30, 1, 2, 4 h, the blood was obtained by cardiac puncture onto heparinized syringes, centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min), and the harvested plasma was kept frozen at -20°C until HPLC analysis.

For the intraperitoneal (i.p.) administration, the free fisetin (prepared as described above for the i.v. route) was injected at the maximum tolerated dose by this route (223 mg/kg). The liposomal fisetin dose was 21 mg/kg corresponding to an injected volume of 260 to 500 µL depending of the percent encapsulated fisetin of a given preparation. Mice were sacrificed at 15, 30 min, 60, 90, 120, 180 and 240 min, the blood was obtained by cardiac puncture onto heparinized syringes, centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min), and the plasma was kept frozen at -20°C until HPLC analysis. All animal experiments have been carried out in accordance with institutional and

French regulations concerning the protection of animals, and with the European Commission regulations.

○ *Determination of fisetin plasma concentration*

Fisetin concentration in plasma was determined by HPLC as followed: to 100 μ L of plasma was added 60 μ L of a morin methanolic solution at 0.5 mg/mL (internal standard), and 200 μ L of cold acidified methanol (methanol:perchloric acid 70%, 200:1, v:v) to precipitate proteins. After vortexing for 5 min, the samples were kept on ice for 15 min, and centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C. The supernatant (100 μ L) was injected onto a reversed-phase HPLC system as described above with the UV detector set at 360 nm. The ratio of the area of the fisetin peak divided by the internal standard peak area was reported to a calibration curve to determine the concentration of fisetin. Calibration curves were linear with correlation coefficients near unity. The quantification limit of the system was 0.1 μ g/mL.

○ *Pharmacokinetic parameters determination*

The following non compartmental pharmacokinetic parameters were calculated using standard methods [42]: maximum concentration (C_{max}) extrapolated to time zero for the i.v. route; area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the time of the last measurable concentration (AUC_{0-t}) calculated by the trapezoidal method; terminal half-life = $\ln 2/K_{el}$, where K_{el} is the terminal elimination rate constant. The mean residence time (MRT) was calculated as the $AUMC/AUC$, where AUMC is the area under the first moment curve. Clearance was calculated as the dose/AUC, and the volume of distribution V_{ss} as the $CL \times MRT$. The mean absorption time (MAT) after i.p. administration was calculated as the $MRT_{i.p.}$ minus $MRT_{i.v.}$ [42]. Relative bioavailability (F_{REL}) comparing the free fisetin and its liposomal formulation for the same route of administration was determined by the following formula: $F_{REL} = (AUC_{LIPO} \times Dose_{FREE}) / (AUC_{FREE} \times Dose_{LIPO})$.

2.6 Antitumour activity in mice

○ *Fisetin treatment*

Female 8 weeks old C57BL/6J mice (body weight 18-22 g) (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were used for antitumour evaluation. Lewis lung tumor fragments (about 2 mm diameter) were implanted subcutaneously (s.c.) bilaterally into mouse

flanks using a 12 gauge trocar. Four days after tumor implantation, mice received the following i.p. treatments (5 mice per group from day 4 to 8 and from day 11 to 14): 5 free fisetin control mice received solvent (20% DMSO, 20% PEG 200, 60% saline), 5 liposome control mice received an empty liposomal formulation, 5 mice received the free fisetin preparation at 21 mg/kg and 5 mice received liposomal fisetin at 21 mg/kg. The volumes of injection were comprised between 200 and 400 μL , depending on the preparation used. Tumor growth was assessed by caliper bi-dimensional measurements (in mm) and the tumor volume (mm^3) was calculated according to the following formula: $\text{width}^2 \times \text{length}/2$. The weight, behavior and external aspect of the mice were controlled every day in order to detect any suffering.

- *Combined treatments: cyclophosphamide and fisetin*

Three groups of four mice were implanted s.c. bilaterally with LLC tumor fragments, and four days later the mice received the following i.p. treatments (4 mice per group) for 12 consecutive days (days 4 to 15): 4 control mice received an empty liposomal preparation i.p.; 4 mice received the empty liposomal preparation i.p. and cyclophosphamide at 30 mg/kg subcutaneously (s.c.); 4 mice received the i.p. fisetin liposomes corresponding to 35 mg/kg of fisetin and cyclophosphamide s.c. at 30 mg/kg. Tumor volumes were assessed as described above.

2.7 Data analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Comparison between tumor volumes was assessed by the Student *t* test.

3. Results

3.1 Characteristics of the liposomal fisetin preparation

The liposomal fisetin was formulated according to our previously described preparation [40], with minor modifications, as described in the Materials and methods section. The resulting liposomal preparation presented a fisetin encapsulation of 65%, a mean liposome diameter of 173.5 ± 2.4 nm and a good homogeneity with a polydispersity index of 0.181 ± 0.016 .

3.2 Effects of liposomal fisetin on Lewis lung carcinoma cells (LLC)

Before evaluating the liposomal fisetin formulation *in vivo*, we first verified its morphological and cytotoxicity effects on Lewis lung carcinoma cells (LLC), which will be grafted as solid tumors in mice in this study. Figure 1B shows that free fisetin at a concentration of 4.4 $\mu\text{g/mL}$ presented a typical morphological change of LLC cells with elongated membrane pseudopods after a 2 h incubation period. Liposomal fisetin (4.4 $\mu\text{g/mL}$) also presented similar morphological alterations compared to free fisetin (Fig. 1C), whereas LLC cells exposed to empty liposomes did not show any pseudopods (Fig. 1A) and were actually identical to control cells not exposed to empty liposomes (not shown).

The quantification of LLC cells in the sub-G1 phase by flow cytometry indicated that only 5% of cells were in apoptosis when exposed to empty liposomes for 24 h (Fig. 1D). When exposed to free fisetin at 11.1 $\mu\text{g/mL}$ during 24 h (Fig. 1E), 35% of cells were in apoptosis, whereas a similar concentration and duration of treatment with liposomal fisetin showed that the percent apoptotic cells was increased to 45% of the cells (Fig. 1F).

Taken together, these data clearly indicate that liposomal fisetin is indeed biologically active on LLC cells, as shown by its morphological effects similar to free fisetin, and also by its induction of apoptosis after a 24 h exposure.

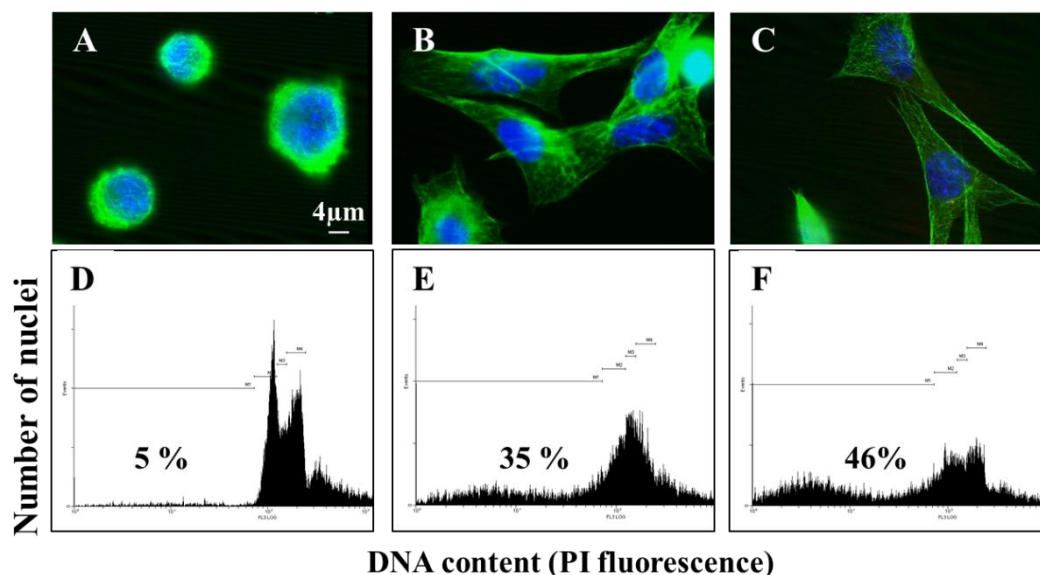


Figure 1. Effects of free and liposomal fisetin on Lewis lung carcinoma cells (LLC).

Morphological effects: Lewis lung carcinoma cells (LLC) were treated for 2 h with empty liposomes (A), free fisetin at a concentration of 4.4 $\mu\text{g/mL}$ (B), and with liposomal fisetin at 4.4 $\mu\text{g/mL}$ (C). The green color shows the tubulin network and the blue represents the cell nuclei stained with DAPI. Magnification $\times 400$, scale bar 4 μm . Cell cycle effects: LLC cells were exposed for 24 h to empty liposomes (D), to free fisetin at a concentration of 11 $\mu\text{g/mL}$ (E), and to liposomal fisetin at 11 $\mu\text{g/mL}$ (F).

3.3 Liposomal fisetin pharmacokinetics and bioavailability

We next examined the influence of the liposomal formulation on fisetin bioavailability in mice. To do so, we compared the pharmacokinetics of free and liposomal fisetin in mice administered via the intravenous (i.v.) or the intraperitoneal (i.p.) route. Figure 2 depicts the fisetin plasma concentrations following the i.v. and i.p. administration of either the free fisetin or its liposomal preparation. The pharmacokinetic parameter values are presented in Table 1.

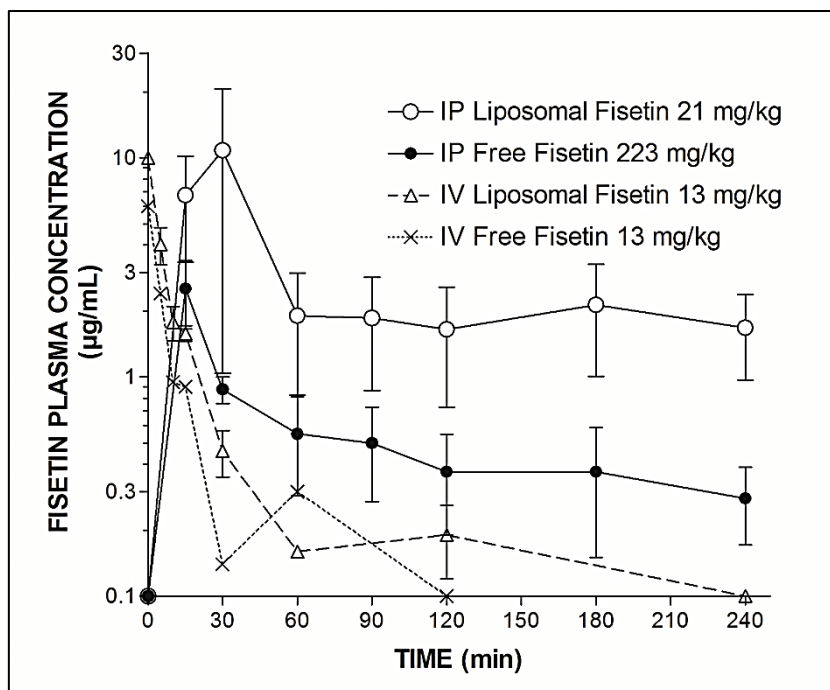


Figure 2. Pharmacokinetics of free fisetin and liposomal fisetin.

Mice received free fisetin administered either i.v. at 13 mg/kg (X symbol), or i.p. at 223 mg/kg (solid circles). Liposomal fisetin was administered i.v. at 13 mg/kg (open triangles) or i.p. at 21 mg/kg (open circles). Fisetin plasma concentrations were determined by HPLC, as described in the Materials and methods section. Mean of at least 3 mice per time point $\pm$ SEM.

Parameter	Intravenous		Intraperitoneal	
	Free fisetin	Liposomal Fisetin	Free fisetin	Liposomal Fisetin
Dose (mg/kg)	13	13	223	21
C_{max} (µg/mL)	6.0	10.0	2.5	10.82
Elimination constant (K_{el}) (h^{-1})	1.136	0.18	0.17	0.0125
Terminal half-life (h)	0.61	3.8	4.1	55.4
$AUC_{0 \rightarrow 4 h}$ (µg.h/mL)	1.12	1.84	2.27	11.85
AUMC (µg.h ² /mL)	1.09	1.92	3.87	20.96
Mean residence time (MRT) (h)	0.97	1.04	1.71	1.77
Mean absorption time (MAT) (h)	-	-	0.74	1.48
Clearance (CL) (L/kg/h)	11.64	7.06	98.2	1.77
Volume of distribution (Vss) (L/kg)	11.33	7.35	167	3.13
Relative bioavailability ^a (F_{rel})	-	-	1	55

Table 1. Fisetin pharmacokinetic parameters after intravenous or intraperitoneal administration of free fisetin and liposomal fisetin in mice. ^a $F_{rel} = (AUC_{LIPO} \times Dose_{FREE}) / (AUC_{FREE} \times Dose_{LIPO})$

Concerning the i.v. administration of free fisetin and the fisetin liposomal formulation, some differences were observed in terms of maximum concentrations (6 versus 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively), terminal half-lives (0.61 versus 3.8 h, respectively), and clearance (11.64 versus 7.06 L/kg/h). The comparison of free versus liposomal fisetin administered at the same dose level of 13 mg/kg disclosed that the liposomal formulation offered a modest, but significant advantage in systemic exposure as expressed by its 64% increase in AUC for the liposomal formulation versus the free fisetin (AUC of 1.12 versus 1.84 $\mu\text{g.h/mL}$, respectively).

Considering that the i.v. administration was relatively toxic to mice and did not offer a clear advantage for the liposomal form over the free fisetin, we next explored its i.p. administration. After the i.p. administration of liposomal fisetin at 21 mg/kg and the i.p. injection of free fisetin at 223 mg/kg, which is the active dose in LLC tumor bearing mice, it can be observed that liposomal fisetin yielded higher fisetin plasma concentrations, although the dose was 10 times lower than that of the free fisetin dose (Fig. 2). Table 1 presents the pharmacokinetic parameter values for the different formulations of fisetin injected via the i.p. route. The liposomal fisetin allowed increasing significantly the plasma concentrations of fisetin throughout the examination period which translated into a 5-fold increase in AUC, with a liposomal fisetin dose 10 times lower than that of the free fisetin. Taking into account the administered dose, the calculated relative bioavailability (F_{rel}) was found to be 55-fold higher for the liposomal fisetin compared to the free fisetin.

3.4 Organ distribution of liposomal fisetin

We next assayed the fisetin concentrations in the major organs at 15 min after the i.v. administration of a dose of 21 mg/kg of free fisetin or of its liposomal formulation. Figure 3A shows that fisetin blood concentrations were 2-fold higher in mice receiving liposomal fisetin compared to free fisetin. The liver also presented a 5-fold increase in fisetin concentration after liposomal fisetin administration compared to the free fisetin (Fig. 3B). The other sampled organs (lungs, kidneys, spleens) and the LLC tumours did not show significant differences in fisetin exposure between the liposomal formulation versus the free fisetin. Similar organ distribution results were observed at 2 h post i.p. administration of liposomal fisetin (data not shown).

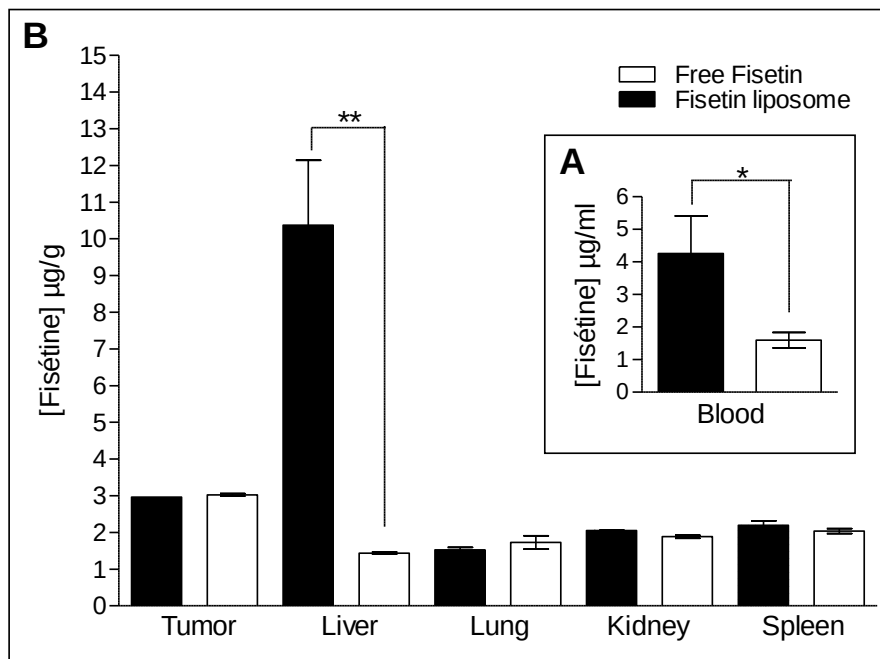


Figure 3. Fisetin tissues distribution. Fisetin concentration in tissues 15 min after the i.v. administration of free fisetin (empty bars) or liposomal fisetin (solid bars) at a dose of 21 mg/kg in Lewis lung tumor bearing mice. (A) Blood concentration expressed in µg/ml. (B) Fisetin concentrations in tumors and the indicated organs, expressed in µg/g. Mean $\pm$ SEM from 3 independent values. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Student t test).

3.5 Liposomal fisetin antitumoral activity

The effect of liposomal fisetin on Lewis lung tumor growth in mice is presented in Figure 4A. It can be observed that a low free fisetin dose of 21 mg/kg can nonetheless elicit a tumor growth delay (T-C) of 1.6 day (Table 2). When the same fisetin dose was administered as a liposomal formulation, it could significantly increase the tumor growth delay to 3.3 days, which is a significant effect in this rapidly growing and highly invasive tumor.

With regard to toxicity, the control liposomal formulation and the fisetin liposomes were not toxic as shown by the negligible weight loss at nadir for the former (-0.1 g) and weight gain of 0.3 g for the latter at day 5 (Fig. 4B, Table 2). For the solvent used to dissolve the free fisetin and the free fisetin solution, they were clearly more toxic than the liposomal formulations as shown in Fig. 4B, with a mean body weight change of -1.2 g and -0.9 g, respectively (Table 2). This last toxicity could probably be attributed to the solvent composition containing 20% DMSO, 20% PEG200 and 60% saline.

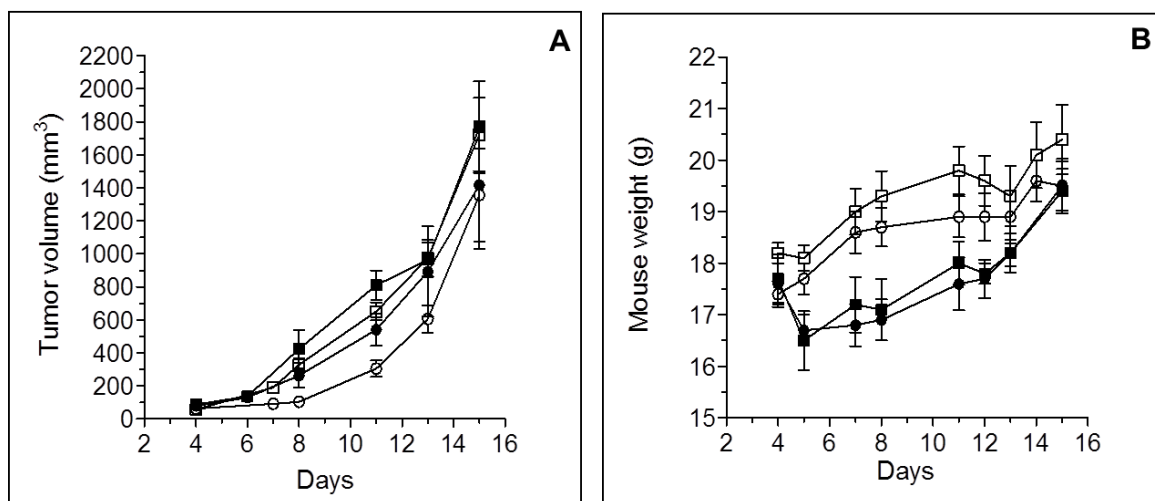


Figure 4. Antitumoral effect of liposomal fisetin. Mice (C57BL/6J) bearing Lewis lung carcinoma tumors were treated with solvent of free fisetin (solid squares), free fisetin (solid circles), empty liposomes (empty squares) and liposomal fisetin (empty circles) at the dose of 21 mg/kg. Mice were treated daily from day 4 to day 8 and from day 11 to day 14.

Treatment	Fisetin dosage (mg/kg/dose)	Schedule (day)	Total fisetin dose (mg/kg)	Mean body wt change (g/mouse)	Median tumor volume (mm ³ d11)	%T/C	Time for median tumor to reach 500 mg (day)	T-C (day)
Solvent Control ^b	-	-	-	-1.2 (d5)	804.5		9.2	-
Free fisetin ^c	21	d4-d8 d11-d14	189	-0.9 (d5)	526.0	65.4	10.8	1.6
Empty liposome ^d	-	d4-d8 d11-d14	-	-0.1 (d5)	569.1	70.7	9.8	0.6
Liposomal fisetin ^e	21	d4-d8 d11-d14	189	+0.3 (d5)	317.0	39.4	12.5	3.3

Table 2. Antitumoral effect of free and liposomal fisetin.^a

^a Four groups composed of 5 female 8 weeks old C57BL/6J mice were implanted s.c. bilaterally with Lewis lung tumour fragments and treatments were initiated 4 days later. The indicated treatments were administered from day 4 to 8 and from day 11 to 14.

^b Control mice received the solvent used to dissolve the free fisetin preparation composed of 20% DMSO, 20% PEG 200, 60% saline. There were no drug death recorded during this study.

^c Free fisetin preparation at 21 mg/kg containing the solvent composed of 20% DMSO, 20% PEG 200, 60% saline.

^d Empty liposomal formulation as described in Materials and methods section.

^e Fisetin liposomal preparation at 21 mg/kg, as described in Materials and methods section.

3.6 Antitumoral activity of the combination of liposomal fisetin and cyclophosphamide

Optimization of the liposomal fisetin therapy was next attempted by co-treatment with cyclophosphamide. Indeed, additive effects of fisetin combined with cyclophosphamide had previously been shown on Lewis lung tumors [19]. The dose of i.p. liposomal fisetin was increased to 35 mg/kg and cyclophosphamide was

administered s.c. at a relatively low dose of 30 mg/kg. Figure 5 shows that the treatment of Lewis lung tumor bearing mice led to a tumor growth delay (T-C) of 4.2 days for the treatment of cyclophosphamide combined with empty liposomes, whereas the combination of cyclophosphamide and liposomal fisetin led to a significantly improved anticancer effect with a T-C of 7.2 days (Table 3). This drug combination was not toxic, as shown by negligible body weight change in the treated animals.

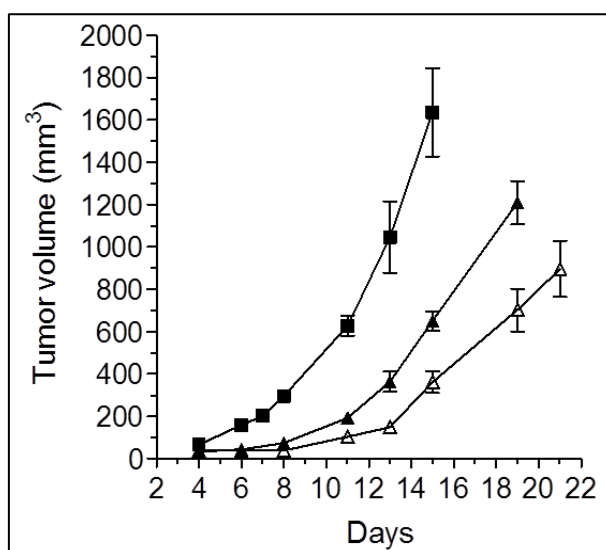


Figure 5. Antitumoral effect of liposomal fisetin combined with cyclophosphamide. Mice bearing Lewis lung carcinoma tumor were treated with empty liposomes (black squares), with empty liposomes and cyclophosphamide at 30 mg/kg (black triangles), and liposomal fisetin at the dosage of 35 mg/kg in combination with cyclophosphamide 30 mg/kg (white triangle). Mice were treated daily from day 4 to day 15.

Treatment	Fisetin dosage (mg/kg/dose)	Schedule (day)	Total dose (mg/kg)	Mean body wt change [g/mouse (day of nadir)]	Median tumor volume (mm ³ d11)	%T/C	Time for median tumor to reach 500 mg (day)	T-C (day)
Control ^b	-	d4 to d15	-	-	644.9	-	9.8	-
Empty liposome + CPA ^c	-	d4 to d15	-	+0.3 d4-d8	186.5	39.8	14	4.2
	30		330	-0.25 d7-d8				
Liposomal Fisetin + CPA ^d	35	d4 to d15	420	+0.75 d4-d8	109.7	22.1	17	7.2
	30		330	-0.25 d7-d8				

Table 3. Antitumoral effect of liposomal fisetin combined with cyclophosphamide.^a

^a Three groups of 4 mice bearing LLC tumours.

^b Control mice received an empty liposomal preparation i.p. as described in the Materials and methods section.

^c Mice received the empty liposomal preparation i.p. and cyclophosphamide (CPA) at 30 mg/kg s.c.

^d Mice received the i.p. fisetin liposomes corresponding to 35 mg/kg of fisetin and cyclophosphamide (CPA) s.c. at 30 mg/kg.

4. Discussion

The main objectives of this study were to evaluate the *in vivo* pharmacokinetics and antitumour activity of liposomal fisetin in tumor bearing mice. Cellular results indicated that the cytotoxic activity of fisetin was maintained on Lewis lung carcinoma cells despite its encapsulation, which confirmed our previous study where we had shown that liposomal fisetin was internalized and retained the cytotoxic and morphological effect of the free fisetin on endothelial cells [40].

Cell cycle analysis yielded some information about the rate of apoptosis. Induction of apoptosis by fisetin in various tumor cells has been recently reported in the literature [11-14,27]. After exposure of the tumor cells (LLC) to free or liposomal fisetin, we observed an increase of the sub-G1 phase, meaning that apoptosis could either be induced by free or encapsulated fisetin. This is the first time that cell cycle arrest is evidenced with an encapsulated form of fisetin.

Following these encouraging cellular results, liposomal fisetin was next evaluated for its capacity to potentially improve fisetin pharmacokinetics, as could be expected from a liposomal formulation of this size [43]. We demonstrated that the i.p. administration of the liposomal fisetin led to a significant improvement in bioavailability compared to the i.p. administration of the free fisetin, with a 55-fold increase in relative bioavailability compared to the free fisetin administered via the same route. This increased bioavailability and prolongation of residence time has previously been observed for another flavonoid [39], although this report is the first to demonstrate the pharmacokinetic advantage of administering fisetin in its liposomal formulation. This enhanced bioavailability of the liposomal fisetin is also probably resulting from the unique lymphatic distribution after i.p. administration, which is a favorable property, especially with anticancer drugs that must access lymph nodes which are frequently harboring metastases [44].

The i.v. administration of the liposomal fisetin led to a significant but low improvement in the fisetin bioavailability. This could indicate a fast exchange of this lipophilic compound with physiological membranes post-administration in mice, as suggested by Fahr *et al.* [38]. However, the fact that the amount of fisetin could be significantly increased in the liver 15 minutes post i.v. administration tend to show that part of the fisetin was still associated to its carrier. The antitumor effect improvement obtained confirmed this point.

Liposomal forms of anthracyclines were shown to improve the antitumor effect of the drug via the enhancement permeabilisation and retention effect [45]. The

abnormalities of the endothelial barriers in the tumors would favor liposome extravasation in the tissue and ultimately increase the concentration of the drug in the tumor. In this study, we could show that the bioavailability of fisetin was increased in the blood, but we could not evidence any increase in fisetin concentration in the tumor. Another point to consider here is the fact that only fisetin was quantified in the tumor, but that several fisetin metabolites are indeed formed *in vivo* in mice, and that at least one of them is an active compound (geraldol), as reported in Touil *et al.*[46]

We have also shown that liposomal fisetin could elicit a significant antitumour activity *in vivo* in Lewis lung tumor bearing mice. It is noteworthy that a relatively low dose of the liposomal fisetin corresponding to 21 mg/kg of fisetin was able to reduce the tumor volume, whereas a 10-fold higher dose (223 mg/kg) was required to obtain a similar tumor growth inhibition with the free fisetin, as reported by Touil *et al.* [19]. This indicates that the liposomal formulation of fisetin is favorable to its anticancer action *in vivo* probably by increasing its bioavailability, as shown in this study.

To optimize the liposomal fisetin therapy we also combined this treatment with cyclophosphamide, which is an active agent in the LLC tumor. It is of interest that liposomal fisetin could allow a 6-fold fisetin dose reduction from 223 mg/kg for the free form used in our previous study [19], to 35 mg/kg in this study. This low dose liposomal fisetin could nonetheless elicit a significant growth delay of 7 days when combined with cyclophosphamide, which is an important anticancer effect in this drug resistant tumor.

Another important point to stress is that this drug combination was not toxic, as shown by negligible body weight change in the treated animals. Reduced non specific toxicity has also been observed with other liposomes, e.g., liposomal form of doxorubicin which allowed a dose reduction that permitted to reduce the cardiac toxicity of this drug [47]. In the liposomal fisetin case, a reduced toxicity associated with a higher bioavailability are the key points for the overall antitumor effect obtained in this study with the liposomal fisetin form.

5. Conclusion

In conclusion, we have developed a liposomal formulation of fisetin that allowed increasing markedly its bioavailability after i.p. administration. In addition, low dose of liposomal formulation of fisetin was able to improve fisetin antitumoral activity in tumor bearing mice compared to the free fisetin. Combination with cyclophosphamide further enhanced the antitumoral action of liposomal fisetin. This liposomal fisetin

could therefore advantageously be employed to improve the antiangiogenic and anticancer activities of this flavonoid, as well as other flavonoids sharing similar problems of *in vivo* administration because of their inherent low water solubility.

Acknowledgements. This research was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by a grant from the Institut National du Cancer (INCa, Boulogne-Billancourt, France).

References

- [1] B.H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther.* 96 (2002) 67-202.
- [2] M. Lopez-Lazaro, Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2 (2002) 691-714.
- [3] E. Middleton, Jr., C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 673-751.
- [4] Y.J. Surh, Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 768-780.
- [5] S.C. Gupta, J.H. Kim, S. Prasad, B.B. Aggarwal, Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals, *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 405-434.
- [6] Y.S. Touil, A. Fellous, D. Scherman, G.G. Chabot, Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization, *Nutr. Cancer* 61 (2009) 310-321.
- [7] Y. Arai, S. Watanabe, M. Kimira, K. Shimoi, R. Mochizuki, N. Kinae, Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, *J. Nutr.* 130 (2000) 2243-2250.
- [8] M. Kimira, Y. Arai, K. Shimoi, S. Watanabe, Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods, *J. Epidemiol.* 8 (1998) 168-175.
- [9] H.H. Park, S. Lee, J.M. Oh, M.S. Lee, K.H. Yoon, B.H. Park, J.W. Kim, H. Song, S.H. Kim, Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1), *Pharmacol. Res.* 55 (2007) 31-37.
- [10] O.L. Woodman, E.C. Chan, Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31 (2004) 786-790.
- [11] T.H. Ying, S.F. Yang, S.J. Tsai, S.C. Hsieh, Y.C. Huang, D.T. Bau, Y.H. Hsieh, Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8-/caspase-3-dependent pathway, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 263-273.
- [12] K.Y. Jang, S.J. Jeong, S.H. Kim, J.H. Jung, J.H. Kim, W. Koh, C.Y. Chen, S.H. Kim, Activation of reactive oxygen species/AMP activated protein kinase signaling mediates fisetin-induced apoptosis in multiple myeloma U266 cells, *Cancer Lett.* 319 (2012) 197-202.
- [13] P.M. Yang, H.H. Tseng, C.W. Peng, W.S. Chen, S.J. Chiu, Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy, *Int. J. Oncol.* 40 (2012) 469-478.
- [14] D.N. Syed, F. Afaq, N. Maddodi, J.J. Johnson, S. Sarfaraz, A. Ahmad, V. Setaluri, H. Mukhtar, Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/beta-catenin signaling and decreased Mitf levels, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 1291-1299.
- [15] Y. Suh, F. Afaq, J.J. Johnson, H. Mukhtar, A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappa B-signaling pathways, *Carcinogenesis* 30 (2009) 300-307.
- [16] S. Lee, Y.J. Kim, S. Kwon, Y. Lee, S.Y. Choi, J. Park, H.J. Kwon, Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells, *BMC Reports* 42 (2009) 265-270.
- [17] T. Fotsis, M.S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano, L. Schweigerer, Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis, *Cancer Res.* 57 (1997) 2916-2921.

- [18] T.A. Bhat, D. Nambiar, A. Pal, R. Agarwal, R.P. Singh, Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo--implications for angioprevention, *Carcinogenesis* 33 (2012) 385-393.
- [19] Y.S. Touil, J. Seguin, D. Scherman, G.G. Chabot, Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 445-455.
- [20] X. Lu, J. Jung, H.J. Cho, D.Y. Lim, H.S. Lee, H.S. Chun, D.Y. Kwon, J.H. Park, Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells, *J. Nutr.* 135 (2005) 2884-2890.
- [21] H. Lu, D.J. Chang, B. Baratte, L. Meijer, U. Schulze-Gahmen, Crystal structure of a human cyclin-dependent kinase 6 complex with a flavonol inhibitor, fisetin, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 737-743.
- [22] B. Sung, M.K. Pandey, B.B. Aggarwal, Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkkappaB kinase activation, *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 1703-1714.
- [23] A. Constantinou, R. Mehta, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan, R. Moon, Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships, *J. Nat. Prod.* 58 (1995) 217-225.
- [24] A.J. Olaharski, S.T. Mondrala, D.A. Eastmond, Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin, *Mutat. Res.* 582 (2005) 79-86.
- [25] J. Jankun, S.H. Selman, J. Aniola, E. Skrzypczak-Jankun, Nutraceutical inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment, *Oncol. Rep.* 16 (2006) 341-346.
- [26] M. Böhl, S. Tietze, A. Sokoll, S. Madathil, F. Pfennig, J. Apostolakis, K. Fahmy, H.O. Gutzeit, Flavonoids affect actin functions in cytoplasm and nucleus, *Biophys. J.* 93 (2007) 2767-2780.
- [27] N. Khan, M. Asim, F. Afaq, Z.M. Abu, H. Mukhtar, A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice, *Cancer Res.* 68 (2008) 8555-8563.
- [28] J. Li, Y. Cheng, W. Qu, Y. Sun, Z. Wang, H. Wang, B. Tian, Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108 (2011) 84-93.
- [29] M.R. Guzzo, M. Uemi, P.M. Donate, S. Nikolaou, A.E. Machado, L.T. Okano, Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 10545-10551.
- [30] H. Ragelle, S. Crauste-Manciet, J. Seguin, D. Brossard, D. Scherman, P. Arnaud, G.G. Chabot, Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice, *Int. J. Pharm.* 427 (2012) 452-459.
- [31] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science* 303 (2004) 1818-1822.
- [32] R. Langer, Drug delivery and targeting, *Nature* 392 (1998) 5-10.
- [33] A.A. Gabizon, Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes, *Cancer Res.* 52 (1992) 891-896.
- [34] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D.A. Berk, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, *Cancer Res.* 55 (1995) 3752-3756.

- [35] G. Batist, G. Ramakrishnan, C.S. Rao, A. Chandrasekharan, J. Gutheil, T. Guthrie, P. Shah, A. Khojasteh, M.K. Nair, K. Hoelzer, K. Tkaczuk, Y.C. Park, L.W. Lee, Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 1444-1454.
- [36] M.E. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D.G. Kieback, P. Tomczak, S.P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Alland, C. Tendler, Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 440-449.
- [37] J.M. Siehl, E. Thiel, A. Schmitt, G. Hutter, P.M. Deckert, H. Szelenyi, U. Keilholz, Ifosfamide/liposomal daunorubicin is a well tolerated and active first-line chemotherapy regimen in advanced soft tissue sarcoma: results of a phase II study, *Cancer* 104 (2005) 611-617.
- [38] A. Fahr, H.P. van, J. Kuntsche, M.L. Leigh, Lipophilic drug transfer between liposomal and biological membranes: what does it mean for parenteral and oral drug delivery?, *J. Liposome Res.* 16 (2006) 281-301.
- [39] Z.P. Yuan, L.J. Chen, L.Y. Fan, M.H. Tang, G.L. Yang, H.S. Yang, X.B. Du, G.Q. Wang, W.X. Yao, Q.M. Zhao, B. Ye, R. Wang, P. Diao, W. Zhang, H.B. Wu, X. Zhao, Y.Q. Wei, Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 3193-3199.
- [40] N. Mignet, J. Seguin, M. Ramos Romano, L. Brullé, Y.S. Touil, D. Scherman, M. Bessodes, G.G. Chabot, Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 69-76.
- [41] J.E. Willson, D.E. Brown, E.K. Timmens, A toxicologic study of dimethyl sulfoxide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7 (1965) 104-112.
- [42] M. Gibaldi, D. Perrier, Noncompartmental analysis based on statistical moment theory, in: J. Swarbrick (Ed.), *Pharmacokinetics*, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1982, pp. 409-417.
- [43] A. Gabizon, H. Shmeeda, T. Grenader, Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 388-398.
- [44] Y. Nishioka, H. Yoshino, Lymphatic targeting with nanoparticulate system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 55-64.
- [45] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release* 65 (2000) 271-284.
- [46] Y.S. Touil, N. Auzeil, F. Boulinguez, H. Saighi, A. Regazzetti, D. Scherman, G.G. Chabot, Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1731-1739.
- [47] A.A. Gabizon, O. Lyass, G.J. Berry, M. Wildgust, Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil/Caelyx) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies, *Cancer Invest.* 22 (2004) 663-669.

VI. CONCLUSION ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. Optimisation de la formulation

La fisétine est un composé lipophile qui se localise au sein de la membrane lipidique des liposomes car son coefficient de partage octanol-eau ($\log P$) a été estimé à environ 3,2 [Miteva *et al.*, 2006]. Il est important de noter que l'insertion d'une quantité trop importante de fisétine est susceptible de déstabiliser la membrane et de réduire le taux d'encapsulation. C'est pourquoi, la quantité maximale de fisétine pouvant être introduite au sein de liposomes de formule DOPC/Chol/DSPE-PEG2000 a été évaluée. La formulation qui a donné les meilleurs résultats en termes de taux d'encapsulation, de taille et d'homogénéité des liposomes est la formule DOPC/Chol/DSPE-PEG2000/fisétine (79,5/6/13,2/3,2).

Les études précliniques chez la souris nécessitant un volume important (~20 ml), nous avons cherché à optimiser la préparation DOPC/Chol/DSPE-PEG2000/fisétine en variant ses composants et en testant différents processus de fabrication.

1.1 Choix de la technique de préparation

Pour la préparation de liposomes, plusieurs méthodes ont été testées. Au sein des laboratoires de recherche les deux techniques principalement utilisées sont l'injection éthanolique et la méthode du film [New, 1990]. Nous avons également testé la méthode de la meringue, technique similaire à la méthode du film mais utilisé en général en milieu industriel. Enfin nous avons évalué les techniques de formation des liposomes par méthodes physiques : ultrasons et homogénéisation, car ces techniques n'utilisent pas de solvants organiques [Brandl *et al.*, 1990].

La précipitation des flavonoïdes dans l'éthanol ne permet pas l'utilisation de l'injection éthanolique pour la préparation de liposomes de fisétine malgré sa facilité de mise en œuvre [Thompson *et al.*, 2005] et son faible coût [Rodriguez et Moraes, 2010].

Malgré les efforts fournis pour l'optimisation des méthodes physiques (sonication et homogénéisation), nous n'avons obtenu avec ces méthodes que des préparations non homogènes contenant des agrégats de fisétine.

Les trois étapes préparation d'un film, hydratation et réduction de taille paraissent donc nécessaires à la formation de liposomes de fisétine.

Pour les deux autres méthodes (hydratation d'un film ou d'un extrait sec), seulement une étape diffère (introduction de ce chapitre). Ces techniques donnent

des résultats équivalents, elles peuvent donc être choisies en fonction de la quantité de liposomes à préparer. En effet, la méthode du film sera limitée au-delà d'une concentration en lipides de 100 mg/ml en termes d'homogénéité et d'élimination complète des solvants organiques.

1.2 Optimisation des constituants de la formulation

L'optimisation des constituants de la formulation DOPC/Chol/DSPE-PEG2000/fisétine a été réalisée dans le but de réduire le coût des préparations. Comme des changements dans la composition des liposomes peuvent affecter leurs propriétés [Khan *et al.*, 2008b], nous avons alors évalué les caractéristiques des nouvelles formulations pour choisir les composants alternatifs.

Nous avons testé le remplacement du DOPC ayant 99 % de pureté par du PG90 ayant une pureté moindre, cette substitution n'affecte ni l'homogénéité des formulations ni leur taux d'encapsulation.

Le remplacement du lipide pégylé DSPE-PEG2000, responsable du coût élevé, par un lipide-PEG de même taille ayant une partie lipidique différente a également été exploré. La substitution du DSPE-PEG2000 par le composé Chol-PEG2000-OH apparaît avantageuse en termes de taille, mais diminue le pourcentage d'encapsulation. La localisation de la fisétine dans la bicouche lipidique interfère probablement avec la partie cholestérol du dérivé Chol-PEG2000-OH. Le troisième lipide pégylé que nous avons testé est le DODA-GLY-PEG. La formulation contenant cet amphiphile a montré les meilleures caractéristiques en termes d'index de polydispersité. Lors de son observation en microscopie électronique, une préparation homogène avec une majorité de vésicules unilamellaires a été observée. De plus, cette formulation s'est avérée être meilleure en termes de taux d'encapsulation. Parce qu'il a précédemment été rapporté l'existence d'une relation entre la structure moléculaire des flavonoïdes et leurs interactions avec des modèles de membranes [Goniotaki *et al.*, 2004], nous pouvons émettre l'hypothèse que la structure de la fisétine interagirait différemment en fonction de la nature des lipides. Une hypothèse alternative pour ce gain important dans le taux d'encapsulation pourrait être que la partie DODA des lipides PEG stabilise l'assemblage lipidique dans les liposomes. De plus, lors de test complémentaires, une relative stabilité de la formulation a été montrée. En effet, la forme DOPC/Chol/ DODA-GLY-PEG/fisetine est stable pendant 10 jours en termes de pourcentage d'encapsulation et pendant 59 jours en termes de taille.

Pour conclure, les deux formulations DOPC/Chol/ DODA-GLY-PEG /fisétine ou PG90/Chol/ DODA-GLY-PEG /fisétine pourront être utilisées pour une évaluation *in vitro* et *in vivo*.

2. Conservation des propriétés biologiques *in vitro*

Afin d'évaluer si les propriétés cytotoxiques de la fisétine sont conservées lorsqu'elle est encapsulée, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés sur des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) et de carcinome de côlon 26 (C26). Les courbes de survie pour les cellules LLC n'ont pas montré de différence entre les deux formes testées et la concentration requise pour tuer 50 % des cellules (IC50) est de 15,5 µg/mL pour la fisétine libre et de 15,0 µg/mL pour la fisétine liposomale. Nous avons également observé des résultats similaires pour la lignée tumorale C26 avec une IC50 de 15,7 µg/mL et 16,7 µg/mL pour la fisétine libre et la forme liposomale, respectivement.

Une des propriétés de la fisétine est d'induire une morphologie spécifique [Touil *et al.*, 2009]. Nous avons donc évalué si cet effet était conservé en incubant les cellules endothéliales avec de la fisétine sous forme liposomale. Nous avons observé que la fisétine liposomale est capable de former des pseudopodes ce qui indique que la fisétine encapsulée conserve ses propriétés de modification de la morphologie sur les cellules endothéliales. De plus lors de ces tests, nous avons pu observer une internalisation des liposomes marqués au sein de ces cellules par microscopie de fluorescence.

Ces résultats, en termes de cytotoxicité et de modifications morphologiques indiquent que la fisétine est rapidement relarguée hors des liposomes, ce qui a été rapporté pour d'autres médicaments lipophiles [Fahr *et al.*, 2006].

Nous avons également réalisé des analyses du cycle cellulaire, qui permettent de fournir une information sur le taux d'apoptose, lorsqu'un composé est incubé en présence des cellules. L'induction de l'apoptose par la fisétine sur différentes lignées cellulaires a récemment été décrite [Ying *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Syed *et al.*, 2011]. Nous avons également observé ces résultats sur la lignée LLC avec la fisétine libre et la fisétine encapsulée incubée pendant 24 h à une concentration de 11,1 µg/ml, pour laquelle nous observons une augmentation de la proportion de cellules en phase sub-G1.

3. Pharmacocinétique et biodistribution du liposome

Nous avons démontré que l'administration i.p. du liposome fisétine contribue à améliorer significativement la biodisponibilité relative d'un facteur 55 comparée à la fisétine libre. La biodisponibilité améliorée de la fisétine sous sa forme liposomale résulte probablement de sa distribution lymphatique suite à l'administration intrapéritonéale. Cette observation est intéressante, particulièrement dans le cas de médicaments anticancéreux qui doivent atteindre les ganglions lymphatiques qui hébergent fréquemment des métastases [Nishioka et Yoshino, 2001].

L'administration i.v. de la forme liposomale n'a pas amélioré significativement la biodisponibilité de la fisétine. Ceci pourrait indiquer un échange rapide de ce composé lipophile avec les membranes biologiques après l'administration chez la souris comme l'a précédemment suggéré Fahr [Fahr *et al.*, 2006]. Cependant, le fait que la quantité de fisétine puisse augmenter significativement dans le foie 15 minutes, après administration i.v. tend à montrer qu'une partie de la fisétine reste associée à son vecteur.

Une forme liposomale des anthracyclines a montré une augmentation de l'effet antitumoral par une augmentation de l'effet de perméabilité et de rétention EPR [Maeda *et al.* 2000]. Les anomalies des vaisseaux sanguins tumoraux favoriseraient l'extravasation de liposomes dans les tissus par cet effet EPR, ce qui augmenterait la concentration du principe actif dans la tumeur. Dans cette étude, nous avons montré une augmentation de la biodisponibilité de la fisétine dans le sang, mais nous n'avons pas de preuve de l'augmentation de la concentration de fisétine intratumorale aux temps cours étudiés.

Un autre point qu'il est important de souligner ici est le fait que seule la fisétine a été recherchée et quantifiée et non ses métabolites qui peuvent jouer un rôle dans l'activité de ce flavonoïde [Touil *et al.*, 2011a].

4. Effet antitumoral

4.1 Evaluation sur la lignée de carcinome pulmonaire de Lewis LLC

Nous avons également montré une augmentation de l'effet antitumoral de la formulation liposomale de la fisétine par rapport à la fisétine administrée seule sur le modèle de tumeur LLC. Il est important de noter qu'une dose relativement faible de liposome fisétine (21 mg/kg) est capable de réduire le volume tumoral avec la même efficacité qu'une dose 10 fois plus élevée de fisétine libre [Touil *et al.*, 2011b]. De

plus, nous avons également démontré que l'effet bénéfique de l'association avec le cyclophosphamide était conservé avec la forme liposomale. Ces résultats indiquent que la forme liposomale est favorable à la délivrance d'anticancéreux *in vivo* probablement par l'augmentation de sa biodisponibilité.

De plus, une réduction non spécifique de la toxicité a pu être mise en évidence par le suivi du poids des souris pendant la durée de l'étude. Au cours du développement du Doxil[®], il a été observé que la cardiotoxicité non spécifique de l'anthracycline libre était diminuée par l'utilisation d'une forme liposomale, ce qui a indirectement augmenté son efficacité [Gabizon *et al.* 2004].

Une toxicité réduite associée à une biodisponibilité augmentée est peut-être l'explication de l'efficacité antitumorale sur la lignée LLC que nous avons observé avec la forme liposomale. Cette formulation pourrait donc avantageusement être utilisée pour d'autres flavonoïdes partageant des problèmes semblables d'administration *in vivo* en raison de leur faible solubilité dans l'eau.

4.2 Evaluation sur la lignée de carcinome de côlon C26

Suite à ces résultats intéressants en termes d'activité antitumorale sur la lignée LLC, nous avons évalué l'effet du même schéma de traitement sur la lignée tumorale côlon 26.

Pour cela, des groupes de 5 souris Balbc/J d'environ 18-22 grammes ont été utilisées. Les tumeurs de côlon 26 ont été implantées en ectopique (n=10) sur le flanc ou en orthotopique sur le caecum (n=10), comme décrit dans l'article 2 chapitre II. Quatre jours après l'implantation tumorale, les liposomes DOPC/Chol/DODA-PEG ou DOPC/Chol/DODA-PEG/fiséline ont été administré par voie i.p. à la dose de 21 mg/kg. Le traitement a été effectué tous les jours, de jour 4 à jour 8, et de jour 11 à jour 14. La détermination du volume tumoral a été effectuée à l'aide d'un pied à coulisse pour le modèle ectopique et par échographie pour le modèle orthotopique. La Figure III.15 présente les résultats obtenus pour les deux sites d'implantations. La courbe de gauche présente l'évolution du volume tumoral en fonction du temps post implantation. La courbe de droite montre l'évolution pondérale des souris.

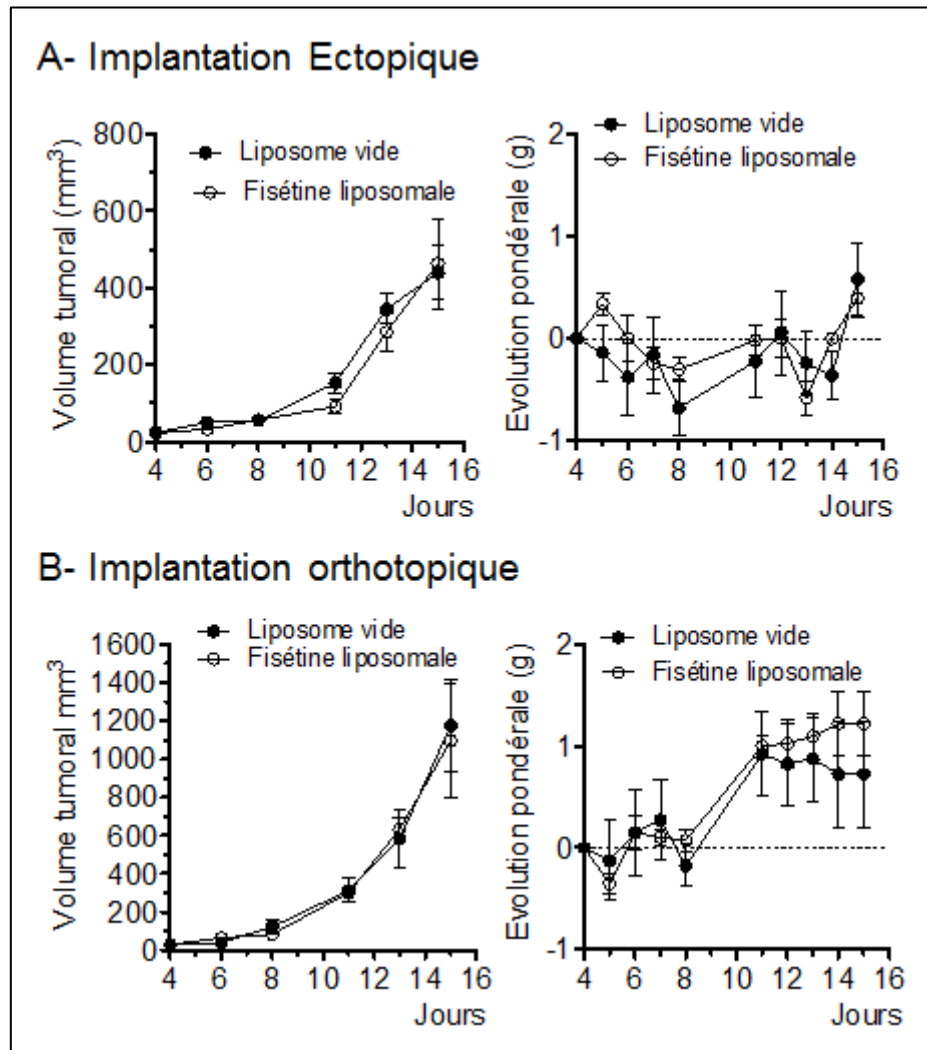


Figure III.6 : Détermination de l'efficacité du traitement fisétine sur la lignée tumorale de côlon 26 sur les modèles ectopique (A) et orthotopique (B). Gauche : évolution du volume tumoral en fonction du temps post implantation. Droite : évolution pondérale calculée par rapport au poids en début de traitement (J4).

Nous n'avons pas observé de régression tumorale sur le modèle de tumeur de côlon C26 quel que soit le site d'implantation. L'activité cytotoxique obtenue *in vitro* sur cette lignée ($IC_{50} = 15,7 \mu g/mL$) peu différente celle de la lignée LLC ($IC_{50} = 15,5 \mu g/mL$), ne s'est pas traduite par une activité antitumorale *in vivo*. Cette observation a déjà été décrite par Mayhew en 1987, qui a trouvé une sensibilité à la doxorubicine des cellules C26 *in cellulo* mais pas *in vivo*. Cette constatation a été attribuée à l'incapacité du médicament à atteindre une concentration intratumorale suffisante [Mayhew *et al.*, 1987]. Le transport passif de nanovecteurs grâce à l'effet EPR a été observé pour des tumeurs très vascularisées ce qui est le cas des tumeurs LLC. En revanche, pour les tumeurs qui sont moins vascularisées celles du côlon, l'utilisation d'une stratégie de ciblage passif semble moins appropriée, à cause de la faible quantité de vecteur entrant dans la tumeur. Ces observations ont été rapportées dans la littérature [Hu et Zhang, 2009]. De plus, le fait que les

cytostatiques devraient préférentiellement être évalués sur des modèles orthotopiques afin de conserver un stroma « représentatif » n'a pas été confirmé dans cette étude. Cependant, il a déjà été décrit que la tumeur de côlon C26 était difficile à guérir les médicaments anticancéreux actuellement disponibles [Polin *et al.*, 2011 ; Corbett *et al.*, 1977].

5. Evaluation de l'intérêt d'un ciblage des liposomes fisétine

Afin d'augmenter la concentration intratumorale de la fisétine, il est possible de recourir à un ciblage par insertion d'un ligand dans la préparation liposomale. Pour cela nous avons préparé des liposomes contenant un lipide DODA-PEG5000-RGD.

Le Tableau III.4 présente les résultats obtenus pour la lignée LLC et la lignée C26 en terme de biodistribution. Les résultats sont présentés en pourcentage de dose injectée et correspondent à la quantité de vecteur détecté.

Organe	Liposome	LLC	C26
Foie	LF	4,9 ± 2,4	2,4 ± 1,6
	LF-RGD	7,5 ± 2,1	6,8 ± 1,2
Rate	LF	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,4
	LF-RGD	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Intestin	LF	25,7 ± 6,5	17,7 ± 3,2
	LF-RGD	14,2 ± 1,9	12,2 ± 2,1
Tumeur	LF	0,9 ± 0,3	0,2 ± 0,1
	LF-RGD	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Poumon	LF	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1
	LF-RGD	0,5 ± 0,2	ND
Sang	LF	7,4 ± 2,6	5,0 ± 3,2
	LF-RGD	15,9 ± 4,3	22,8 ± 2,9

Tableau III.4 : Biodistribution 2 h après injection i.p. du liposome fisétine (LF) et du liposome fisétine-RGD (LF-RGD) chez la souris porteuse de tumeur LLC ou C26. Résultats présentés en % de dose injectée (moyenne ± erreur standard à la moyenne SEM).

On peut noter que pour les 2 lignées tumorales testées nous observons un effet bénéfique de la formulation RGD, car la fraction sanguine à deux heures est significativement plus importante dans le cas de la tumeur de côlon 26 (test de Mann Whitney $p = 0,021$). Cette expérience préliminaire a été effectuée seulement 2 h après injection des liposomes. Il serait nécessaire d'établir la fraction de liposome dans le sang et les organes à 24 et 48 h, car l'accumulation tumorale est souvent plus importante à 24h et 48h [Schiffelers *et al.*, 2003]. De plus, il a été décrit qu'un effet antitumoral pouvait être observé après un traitement avec un liposome ciblant RGD sur la lignée C26. Ces formulations RGD avaient été détectées en quantité équivalentes à celle des liposomes non ciblant au sein des tumeurs [Schiffelers *et*

al., 2003]. Enfin, il serait intéressant de quantifier la fraction de fisétine délivrée au sein de la tumeur par technique HPLC, par exemple.

CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Vers un bon modèle d'étude

Nous avons vu dans le chapitre II de ce manuscrit l'importance des modèles animaux pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques. La bonne connaissance de ces derniers est un pré-requis nécessaire à la réalisation d'études pertinentes. Ce travail a permis le développement et la caractérisation de modèles murins de tumeurs qui ont été utilisés d'une part pour tester l'efficacité thérapeutique d'un agent anti-angiogénique, comme nous l'avons vu dans le chapitre III, et d'autre part, pour évaluer des outils d'imagerie. Ainsi, l'évaluation de sondes d'imagerie développées au laboratoire a permis la visualisation de tumeurs LLC [Maldiney *et al.*, 2011] et C26 [Maldiney, travaux non publiés] par ciblage passif. De plus, la visualisation de l'élasticité des tissus par imagerie a été déterminée sur le modèle C26 implanté en ectopique et en orthotopique. Au cours de cette étude, le modèle de carcinome de côlon a été utilisé pour évaluer l'utilisation de l'élastographie par résonance magnétique pour la détection de changement structurel pendant la croissance tumorale ou suite à un traitement antivasculaire. (Annexe 1 : *Colon Tumor Growth and Antivascular Treatment in Mice: Complementary Assessment with MR Elastography and Diffusion-weighted MR Imaging, Radiology, 2012*). Actuellement, des études similaires sont effectuées pour évaluer l'apport de mesures d'élastographie par échographie ultrasonore.

Cependant, la croissance trop rapide de la tumeur orthotopique ne permet pas l'obtention de métastases hépatiques détectables avant le point limite de sacrifice des souris. Une des raisons pourrait être l'invasion plus importante de la tumeur à l'extérieur du côlon qu'à l'intérieur de la muqueuse. Nous avons testé différentes techniques chirurgicales pour remédier à ce problème mais sans succès. Une autre option a été le développement de modèles intraspléniques, pour l'obtention de métastases hépatiques. En effet, des cellules tumorales peuvent être injectées dans le pôle inférieur de la rate pour favoriser la croissance de foyers tumoraux au sein du foie [Wai *et al.*, 2005]. La caractérisation de ce modèle étant peu avancée, elle n'a pu être présentée dans ce manuscrit. Toutefois, on peut déjà mentionner que cette méthode permet l'obtention de métastases hépatiques dont le suivi est réalisé par BLI de 4 jours à 13 jours après implantation. Les techniques d'imagerie, telles l'IRM et l'échographie n'ont pas permis une détection à des temps courts après implantation (Jour 11). Actuellement, nous réalisons les études histologiques et la gradation de ces tumeurs en fonction du nombre et de la taille des métastases. Cette étude fait d'ailleurs l'objet d'un projet en collaboration avec des mathématiciens

spécialistes de l'analyse d'image (ANR jeune chercheur) « Modèles descriptifs et génératifs de l'organisation spatiale de textures d'éléments. Applications à l'imagerie médicale »).

Vers un bon système de délivrance

L'utilisation de nanovecteurs pour la délivrance du principe actif permet de faciliter son administration, d'augmenter sa concentration au sein des tumeurs et de limiter ses effets secondaires. Lors du développement de la formulation de la fisétine, nous avons vu l'importance de ses composants et de sa technique de préparation sur la quantité de principe actif encapsulé.

Actuellement, il existe un intérêt croissant pour les composés de cette famille. De nombreuses études cliniques sont réalisées sur les flavonoïdes en tant que complément alimentaire (51/61 ; [http :www.clinicaltrials.gov/](http://www.clinicaltrials.gov/)) dont 8 dans le domaine du cancer. Ces molécules, hautement intéressantes pour leurs diverses activités bénéfiques sur l'organisme, sont pour la plupart très hydrophobes. La mise au point de cette formulation, de nanoémulsions de fisétine (Annexe 4) et la publication de nos travaux pourraient permettre le développement de formes adaptées à d'autres flavonoïdes.

La formulation liposomale mise au point a permis d'obtenir une efficacité antitumorale plus importante que celle obtenue avec de la fisétine libre. Ces résultats obtenus sur le modèle de carcinome pulmonaire de Lewis implanté en ectopique sont très encourageants. Cependant, ceux-ci n'ont pas été reproduits sur la lignée tumorale côlon 26 probablement à cause de la faible dose de vecteur et de principe actif parvenant jusqu'à la tumeur. Comme nous l'avons préalablement discuté, le stade tumoral, le site d'implantation, la vascularisation et la matrice extracellulaire sont autant de facteurs qui vont influencer l'extravasation des vecteurs. Ainsi, on ne peut directement transposer les résultats d'un modèle tumoral à un autre.

Pour améliorer ces résultats, il existe différents moyens d'augmenter la quantité de liposome et de principe actif au sein des tumeurs :

- au niveau des vecteurs, il est possible de jouer sur le type de PEG, le ciblage de la particule, ou le recouvrement des liposomes par les protéines du sérum ;

- au niveau de l'environnement tumoral, la pression des fluides interstitiels (IFP) ainsi que le pH peuvent être exploités pour favoriser l'action antitumorale.

Les paramètres physico-chimiques semblent gouverner la distribution tissulaire des particules [Dufort *et al.*, 2012]. Les liposomes, que nous avons fabriqués, semblent s'accumuler dans le foie malgré leur pégylation. Afin de limiter la capture des liposomes par le système réticulo-endothélial, il a été rapporté qu'une pré-incubation du liposome dans du sérum ou des protéines sériques pouvait être bénéfique. En effet, une amélioration de l'efficacité de la transfection *in vivo* a été observée après injection de lipoplexes préincubés dans du sérum [Yoshikawa *et al.*, 2011]. Transposé à notre système, cette stratégie pourrait permettre une augmentation de l'effet antitumoral.

Un autre aspect est le phénomène d'élimination accéléré (*ABC phenomenon: accelerated blood clearance*). Ainsi, l'injection d'une première dose de liposomes pégylés réduirait fortement la circulation et augmenterait l'accumulation splénique et hépatique des doses suivantes [Ishida *et al.*, 2003a]. Il a été montré que l'administration répétée de faibles doses de liposomes topotecan pouvait induire un fort effet d'élimination accélérée. Ce phénomène serait lié non seulement à la pegylation des liposomes mais également aux caractéristiques de l'agent cytotoxique encapsulé [Ma *et al.*, 2012]. Un des facteurs qui favorise l'élimination accélérée des liposomes serait liée à la production d'IgM anti-PEG qui pourraient être responsables, dans notre cas, de l'élimination des liposomes fisétine pégylés [Ishida *et al.*, 2003b, Wang *et al.*, 2007]. Il semblerait que l'extrémité du PEG ait une influence dans la création de ces anticorps et qu'une extrémité hydroxylée les limiterait par rapport à une extrémité méthylée [Sherman *et al.*, 2012].

Enfin, il serait également possible d'incorporer des ligands ciblant les intégrines et/ou la sélectine-E afin d'augmenter la quantité de liposome au sein des tumeurs. En effet, des études ont montré un bénéfice de formulations ciblant les intégrines $\alpha\beta 3$ sur l'activité antitumorale dans un modèle de carcinome de côlon C26 [Schiffelers *et al.*, 2003]. Un double ciblage intégrine $\alpha\beta 3$ sélectine-E pourrait également être envisagé. Une meilleure spécificité des formulations fonctionnalisées par deux ligands a été rapportée [Kluza *et al.*, 2010 ; Kluza *et al.*, 2012]. Cette stratégie paraît attractive mais n'a pas été beaucoup exploitée à ce jour peut-être pour la difficulté de synthèse des ligands sialyl. Le suivi cinétique de l'expression des intégrines et sélectines-E, actuellement en cours, permettra de voir si cette stratégie est valide.

Il est également possible de jouer sur les paramètres tels que le pH et la pression intersticielle intratumorale (IFP). Le stroma tumoral a un rôle important dans la régulation de l'IFP [Bouzin et Feron, 2007]. En effet, des études ont démontré qu'il était possible de réduire l'IFP après injection de collagénase ou de hyaluronidase et permettre ainsi un meilleur accès des vecteurs à la tumeur. [Eikenes *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2011]. Dans notre cas, nous pourrions envisager l'administration de hyaluronidase dans le cas de tumeur de côlon et de la collagénase-1 dans le cas de tumeur LLC, plus sensible à cette dernière enzyme [Kato *et al.*, 2012]. Une caractérisation des composants de la matrice extracellulaire des tumeurs sera nécessaire pour déterminer l'enzyme la plus appropriée pour la réduction de l'IFP.

Des études récentes ont également montré qu'une exposition à la chaleur pouvait induire la réduction de l'IFP intratumorale. Cette stratégie est une piste intéressante car, dans cette étude, une diminution de l'IFP, comparable à celle induite par le paclitaxel est obtenue en plaçant les souris à 39,5°C pendant 6 h. De plus cette stratégie permettrait également une réduction de l'hypoxie intratumorale [Sen *et al.*, 2011].

Il serait également envisageable d'exploiter les différences de pH entre les tissus sains et les tissus tumoraux. En effet, il serait possible d'intégrer un résidu PEG pH sensible à la préparation du liposome, qui permettrait ainsi la libération du principe actif au site intratumoral [Masson *et al.*, 2004].

En conclusion, ce travail de thèse a permis la mise en place d'un modèle d'étude répondant à des critères spécifiques à nos études. Ce modèle nous a permis de faire avancer nos connaissances dans le domaine de l'imagerie notamment.

Mes travaux ont également contribué à faire avancer les connaissances dans le domaine de la vectorisation du flavonoïde fisétine et son application potentielle à la thérapie antitumorale.

Evidemment, de nombreuses questions restent en suspens, telles que les cinétiques d'expression des molécules d'adhésion en fonction du site d'implantation de la tumeur, la possibilité de grader plus précisément les tumeurs par des mesures visco-élastiques, l'influence du site d'implantation sur l'évaluation d'un cytotatique. Ainsi, de nouvelles voies d'études s'ouvrent suite à ces travaux que nous poursuivrons dans les années à venir.

REFERENCES

A

- Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci* 2003 Jul;92(7):1343-55.
- Adhami VM, Syed D, Khan N, Mukhtar H. Dietary flavonoid fisetin: A novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management. *Biochem Pharmacol* 2012 Jul 25.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Apr 6;101(14):4954-9.
- Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* 2000 Oct 15;60(8):1051-9.
- Agueros M, Espuelas S, Esparza I, Calleja P, Penuelas I, Ponchel G, et al. Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2011 Jun;8(6):721-34.
- Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990 Oct 15;50(20):6757-64.
- Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(197):55-86.
- Allain V, Bourgaux C, Couvreur P. Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *Nucleic Acids Res* 2012 Mar;40(5):1891-903.
- Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta* 1991 Jan 9;1061(1):56-64.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2012
- American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*. Atlanta Ga: American Cancer Society, 2011.
- Arun R., Ashok K.C.K., Sravanthi V.V.N.S.S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Scienta Pharmaceutica* 2008;76:567-98.
- Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011 Sep;48(5-6):197-216.
- Auguste P, Lemièrè S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005 Apr;54(1):53-61.
- Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008 Aug;8(8):604-17.

B

- Bai F, Matsui T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Ding Y, Sakai T. Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 1998 Oct 16;437(1-2):61-4.
- Baish JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res* 2000 Jul 15;60(14):3683-8.
- Bakalakos EA, Burak WE, Jr., Young DC, Martin EW, Jr. Is carcino-embryonic antigen useful in the follow-up management of patients with colorectal liver metastases? *Am J Surg* 1999 Jan;177(1):2-6.

- Balazs DA, Godbey W. Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv* 2011;2011:326497.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965 Aug;13(1):238-52.
- Bangham AD. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1978;308:2-7.
- Banquy X, Leclair G, Rabanel JM, Argaw A, Bouchard JF, Hildgen P, et al. Selectins ligand decorated drug carriers for activated endothelial cell targeting. *Bioconj Chem* 2008 Oct;19(10):2030-9.
- Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007 Nov;11(11):1473-91.
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 2012;9(3):193-9.
- Bekyarova E, Ni Y, Malarkey EB, Montana V, McWilliams JL, Haddon RC, et al. Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine. *J Biomed Nanotechnol* 2005 Mar 1;1(1):3-17.
- Bendas G, Krause A, Schmidt R, Vogel J, Rothe U. Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery. A potential way of anti-inflammatory therapy. *Pharm Acta Helv* 1998 Jun;73(1):19-26.
- Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J, Rothe U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm* 1999 Apr 20;181(1):79-93.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):401-10.
- Berg WA, Cosgrove DO, Dore CJ, Schafer FK, Svensson WE, Hooley RJ, et al. Shear-wave elastography improves the specificity of breast US: the BE1 multinational study of 939 masses. *Radiology* 2012 Feb;262(2):435-49.
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989 Mar 3;243(4895):1160-5.
- Bhat TA, Nambiar D, Pal A, Agarwal R, Singh RP. Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo--implications for angioprevention. *Carcinogenesis* 2012 Feb;33(2):385-93.
- Bhatia N, Agarwal R. Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *Prostate* 2001 Feb 1;46(2):98-107.
- Bhatti M, Chapman P, Peters M, Haskard D, Hodgson HJ. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease. *Gut* 1998 Jul;43(1):40-7.
- Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 1997 Feb 1;99(3):373-6.
- Blackwell JE, Dagia NM, Dickerson JB, Berg EL, Goetz DJ. Ligand coated nanosphere adhesion to E- and P-selectin under static and flow conditions. *Ann Biomed Eng* 2001 Jun;29(6):523-33.
- Bloquel C, Trollet C, Pradines E, Seguin J, Scherman D, Bureau MF. Optical imaging of luminescence for in vivo quantification of gene electrotransfer in mouse muscle and knee. *BMC Biotechnol* 2006;6:16.
- Boles KS, Schmieder AH, Koch AW, Carano RA, Wu Y, Caruthers SD, et al. MR angiogenesis imaging with Robo4- vs. alphaVbeta3-targeted nanoparticles in a B16/F10 mouse melanoma model. *FASEB J* 2010 Nov;24(11):4262-70.
- Bouzin C, Feron O. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist Updat* 2007 Jun;10(3):109-20.

- Brandl M, Bachmann D, Drechsler M, Bauer K. Liposome preparation by a new high pressure homogenizer gaulin Mlicron Lab 40. *Drug Dev Ind Pharm* 1990;16:2167-91.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2012 Jul 3.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 Sep 13;54(5):631-51.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 1994 Apr 22;264(5158):569-71.
- Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Antiintegrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995 Oct;96(4):1815-22.
- Burger AM, Fiebig HH. Screening using animal systems. In: Baguley BC, Kerr D.J., editors. *Anticancer Drug Development*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 285-99.
- Bybel B, Brunken RC, DiFilippo FP, Neumann DR, Wu G, Cerqueira MD. SPECT/CT imaging: clinical utility of an emerging technology. *Radiographics* 2008 Jul;28(4):1097-113.

C

- Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. *J Nucl Med* 2008 Jun;49 Suppl 2:113S-28S.
- Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, Colasante A, Musiani P, et al. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Jul;17(1):51-9.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000 Apr;6(4):389-95.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
- Chandra M, Frith CH. Spontaneous neoplasms in aged CD-1 mice. *Toxicol Lett* 1992 Jun;61(1):67-74.
- Chang HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine* 2012;7:49-60.
- Chang HI, Cheng MY, Yeh MK. Clinically-Proven Liposome-Based Drug Delivery: Formulation, Characterization and Therapeutic Efficacy. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery* 2012;1(3):195.
- Chen Y, Chang KJ, Hwang LH, Chen CN, Tseng SH. Establishment and characterization of a rectal cancer model in mice: application to cytokine gene therapy. *Int J Colorectal Dis* 2002 Nov;17(6):388-95.
- Cheung AM, Brown AS, Hastie LA, Cucevic V, Roy M, Lacefield JC, et al. Three-dimensional ultrasound biomicroscopy for xenograft growth analysis. *Ultrasound Med Biol* 2005 Jun;31(6):865-70.
- Choy G, O'Connor S, Diehn FE, Costouros N, Alexander HR, Choyke P, et al. Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques* 2003 Nov;35(5):1022-30.
- Clapper ML, Hensley HH, Chang WC, Devarajan K, Nguyen MT, Cooper HS. Detection of colorectal adenomas using a bioactivatable probe specific for matrix metalloproteinase activity. *Neoplasia* 2011 Aug;13(8):685-91.
- Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):661-8.

- Contero A, Richer E, Gondim A, Mason RP. High-throughput quantitative bioluminescence imaging for assessing tumor burden. *Methods Mol Biol* 2009;574:37-45.
- Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975;35(9).
- Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. Evaluation of single agents and combinations of chemotherapeutic agents in mouse colon carcinomas. *Cancer* 1977 Nov;40(5 Suppl):2660-80.
- Corbett TH, Bissery MC, Wozniak A, Plowman J, Polin L, Tapazoglou E, et al. Activity of flavone acetic acid (NSC-347512) against solid tumors of mice. *Invest New Drugs* 1986;4(3):207-20.
- Cosgrove DO, Berg WA, Dore CJ, Skyba DM, Henry JP, Gay J, et al. Shear wave elastography for breast masses is highly reproducible. *Eur Radiol* 2012 May;22(5):1023-32.
- Couvreur P. [Drug vectorization or how to modulate tissular and cellular distribution of biologically active compounds]. *Ann Pharm Fr* 2001 Jul;59(4):232-8.
- Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci* 1997;60(24):2157-63.
- Curwen JO, Wedge SR. The use and refinement of rodent models in anti-cancer drug discovery: a review. *Altern Lab Anim* 2009 Apr;37(2):173-80.

D

- Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2003 Apr;2(4):296-313.
- Dancey JE. Recent advances of molecular targeted agents: opportunities for imaging. *Cancer Biol Ther* 2003 Nov;2(6):601-9.
- Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010 Dec 1;148(2):135-46.
- Dass CR. Cyclodextrins and oligonucleotide delivery to solid tumours. *J Drug Target* 2004 Jan;12(1):1-9.
- De Vincenzo R., Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, et al. In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46(4):305-12.
- Del Valle E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 2004;39(9):1033-46.
- Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010 Jan;10(1):9-22.
- Di Carlo G., Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999;65(4):337-53.
- di Tomaso E., Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, et al. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 2005 Jul 1;65(13):5740-9.
- Dickerson JB, Blackwell JE, Ou JJ, Shinde Patil VR, Goetz DJ. Limited adhesion of biodegradable microspheres to E- and P-selectin under flow. *Biotechnol Bioeng* 2001 Jun 20;73(6):500-9.

- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356(6366).
- Donigan M, Loh BD, Norcross LS, Li S, Williamson PR, DeJesus S, et al. A metastatic colon cancer model using nonoperative transanal rectal injection. *Surg Endosc* 2010 Mar;24(3):642-7.
- Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001;47(4).
- Dufort S, Sancey L, Coll JL. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv Drug Deliv Rev* 2012 Feb;64(2):179-89.
- Duncan R, Ringsdorf H, Satchi-Fainaro R. Polymer therapeutics--polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunities. *J Drug Target* 2006 Jul;14(6):337-41.

E

- Egert S, Rimbach G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Adv Nutr* 2011 Jan;2(1):8-14.
- Eichhorn ME, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Updat* 2004 Apr;7(2):125-38.
- Eikenes L, Tari M, Tufto I, Bruland OS, de Lange DC. Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *Br J Cancer* 2005 Jul 11;93(1):81-8.
- El Ghissassi F., Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol* 2009 Aug;10(8):751-2.
- Elattar TM, Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 2000a Sep;20(5B):3459-65.
- Elattar TM, Virji AS. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 2000b May;20(3A):1733-8.
- Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klibanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation* 2003 Jul 22;108(3):336-41.
- Endo T, Toda M, Watanabe M, Iizuka Y, Kubota T, Kitajima M, et al. In situ cancer vaccination with a replication-conditional HSV for the treatment of liver metastasis of colon cancer. *Cancer Gene Ther* 2002;9(2).
- Espuelas S, Haller P, Schuber F, Frisch B. Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers. *Bioorg Med Chem Lett* 2003 Aug 4;13(15):2557-60.

F

- Fahr A, van HP, Kuntsche J, Leigh ML. Lipophilic drug transfer between liposomal and biological membranes: what does it mean for parenteral and oral drug delivery? *J Liposome Res* 2006;16(3):281-301.
- Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008 Oct;18(5):330-7.
- Fass L. Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol* 2008 Aug;2(2):115-52.

- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010 Mar;46(4):765-81.
- Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 1973 Apr 4;242(118):148-9.
- Fidler IJ. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1986;5(1):29-49.
- Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D. Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(2).
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995 Jan;1(1):27-31.
- Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, et al. Flavonoids, dietary-
- Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009 Oct;19(5):298-309.
- Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol* 2008 Aug 20;26(24):4012-21.
- Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, et al. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 2005 Dec;237(3):794-800.
- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, et al. Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Sep 3;93(18):9764-9.
- Fukai T, Sakagami H, Toguchi M, Takayama F, Iwakura I, Atsumi T, et al. Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 2000 Jul;20(4):2525-36.

G

- Gabizon A, Chemla M, Tzemach D, Horowitz AT, Goren D. Liposome longevity and stability in circulation: effects on the in vivo delivery to tumors and therapeutic efficacy of encapsulated anthracyclines. *J Drug Target* 1996;3(5):391-8.
- Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci* 2012 Mar 12;45(4):388-98.
- Gabizon AA, Lyass O, Berry GJ, Wildgust M. Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil/Caelyx) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies. *Cancer Invest* 2004;22(5):663-9.
- Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V, Kenniston T, Steitz J, Tuting T, et al. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 2000 Dec;7(23):2036-40.
- Garcia-Lafuente A, Guillaumon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res* 2009 Sep;58(9):537-52.
- Genne P. Recherche expérimentale en cancérologie : apport des modèles murins. La recherche médicale à l'aube du XXI^e siècle: recherche médicale et modèle animal. Les Colloques de l'Institut Servier. Elsevier; 2002. p. 53-60.
- Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician* 2008 Feb 1;77(3):311-9.

- Goertz DE, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN, Foster FS. High-frequency Doppler ultrasound monitors the effects of antivasular therapy on tumor blood flow. *Cancer Res* 2002 Nov 15;62(22):6371-5.
- Goniotaki M, Hatziantoniou S, Dimas K, Wagner M, Demetzos C. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2004 Oct;56(10):1217-24.
- Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 2010 Mar;13(1):1-14.
- Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* 1971 Oct;124(5):58P.
- Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1971 Apr;14(2):95-9.
- Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1973 Nov 1;36(3):292-6.
- Griswold DP, Corbett TH. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 1975;36(6 Suppl).
- Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 1998;165(2):129-68.
- Gunawan RC, Auguste DT. The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes. *Biomaterials* 2010 Feb;31(5):900-7.
- Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 2010 Sep;29(3):405-34.
- Guzzo MR, Uemi M, Donate PM, Nikolaou S, Machado AE, Okano LT. Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. *J Phys Chem A* 2006 Sep 14;110(36):10545-51.

H

- Han D, Tachibana H, Yamada K. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001 May;37(5):275-82.
- Han HD, Lee A, Hwang T, Song CK, Seong H, Hyun J, et al. Enhanced circulation time and antitumor activity of doxorubicin by comblike polymer-incorporated liposomes. *J Control Release* 2007 Jul 31;120(3):161-8.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Hansen K, Khanna C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur J Cancer* 2004;40(6).
- Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005;22(1-2).
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 Oct;4(10):806-13.
- 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* 1997 Feb;3(2):177-82.

- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):411-21.
- Hill C. Tobacco epidemiology. *Rev Prat* 2012 Mar;62(3):325, 327-5, 329.
- Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009 Sep;66(17):2873-96.
- Hiraoka K, Kimura T, Logg CR, Tai CK, Haga K, Lawson GW, et al. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. *Cancer Res* 2007 Jun 1;67(11):5345-53.
- Hotta N, Tagaya T, Maeno T, Ayada M, Sato K, Ishikawa T, et al. Advanced dynamic flow imaging with contrast-enhanced ultrasonography for the evaluation of tumor vascularity in liver tumors. *Clin Imaging* 2005 Jan;29(1):34-41.
- Hu CM, Zhang L. Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. *Curr Drug Metab* 2009 Oct;10(8):836-41.
- Hu YL, Tee MK, Goetzl EJ, Auersperg N, Mills GB, Ferrara N, et al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001 May 16;93(10):762-8.
- Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004 Oct;18(5):991-1006, vii.

I

- Institut National du Cancer. ©La polypose adénomateuse familiale, collection Guides patients Cancer info, INCa, septembre 2011.
- Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 2006;1(3):297-315.
- Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* 2003 Feb 14;88(1):35-42.
- Ishida T, Masuda K, Ichikawa T, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int J Pharm* 2003 Apr 14;255(1-2):167-74.
- Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 2006 Dec;11(8):922-32.
- Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000 Sep;64(9):1813-20.

J

- Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987 Jun 15;47(12):3039-51.
- Jamar F, Houssiau FA, Devogelaer JP, Chapman PT, Haskard DO, Beaujean V, et al. Scintigraphy using a technetium 99m-labelled anti-E-selectin Fab fragment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002 Jan;41(1):53-61.
- Jang KY, Jeong SJ, Kim SH, Jung JH, Kim JH, Koh W, et al. Activation of reactive oxygen species/AMP activated protein kinase signaling mediates fisetin-induced apoptosis in multiple myeloma U266 cells. *Cancer Lett* 2012 Jun 28;319(2):197-202.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011 Mar;61(2):69-90.

Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J Control Release* 2012 Mar 10;158(2):194-206.

K

Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa M. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother Radiopharm* 1998 Dec;13(6):447-52.

Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, et al. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* 2000;37(2):223-33.

Kanwar JR, Mahidhara G, Kanwar RK. Antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system. *Drug Discov Today* 2011 Mar;16(5-6):188-202.

Kashtan H, Rabau M, Mullen JB, Wong AH, Roder JC, Shpitz B, et al. Intra-rectal injection of tumour cells: a novel animal model of rectal cancer. *Surg Oncol* 1992 Jun;1(3):251-6.

Kato M, Hattori Y, Kubo M, Maitani Y. Collagenase-1 injection improved tumor distribution and gene expression of cationic lipoplex. *Int J Pharm* 2012 Feb 28;423(2):428-34.

Kelloff GJ, Krohn KA, Larson SM, Weissleder R, Mankoff DA, Hoffman JM, et al. The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005 Nov 15;11(22):7967-85.

Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 1991 Jan;13(1):31-6.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000 Mar;21(3):505-15.

Kessner S, Krause A, Rothe U, Bendas G. Investigation of the cellular uptake of E-Selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2001 Oct 1;1514(2):177-90.

Khan N, Afaq F, Syed DN, Mukhtar H. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis* 2008a May;29(5):1049-56.

Khan R, Rezler E, Lauer-Fields J, Fields G. Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. *Chem Biol Drug Des* 2008b;71:3-7.

Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(3).

Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2006 Mar;1758(3):404-12.

Kluza E, van der Schaft DW, Hautvast PA, Mulder WJ, Mayo KH, Griffioen AW, et al. Synergistic targeting of alphavbeta3 integrin and galectin-1 with heteromultivalent paramagnetic liposomes for combined MR imaging and treatment of angiogenesis. *Nano Lett* 2010 Jan;10(1):52-8.

Kluza E, Jacobs I, Hectors SJ, Mayo KH, Griffioen AW, Strijkers GJ, et al. Dual-targeting of alphavbeta3 and galectin-1 improves the specificity of paramagnetic/fluorescent liposomes to tumor endothelium in vivo. *J Control Release* 2012 Mar 10;158(2):207-14.

Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer* 2000;38(1):116-22.

Kumar R, Chauhan A, Zhuang H, Chandra P, Schnall M, Alavi A. Standardized uptake values of normal breast tissue with 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D: -glucose positron emission tomography: variations with age, breast density, and menopausal status. *Mol Imaging Biol* 2006 Nov;8(6):355-62.

- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999 Jun;38(3):133-42.
- Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 1996 Dec 20;110(1-2):41-8.
- Kuo SM, Morehouse HF, Jr., Lin CP. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 1997 Jun 24;116(2):131-7.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003 Apr;18:65-70.

L

- Langley RR, Russell J, Eppihimer MJ, Alexander SJ, Gerritsen M, Specian RD, et al. Quantification of murine endothelial cell adhesion molecules in solid tumors. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 2).
- Lawrence TS. Radiotherapy for intrahepatic cancers: the promise of emerging sophisticated techniques. *J Support Oncol* 2008 Jan;6(1):14-5.
- Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother* 2002 Aug;56(6):296-301.
- Lee S, Kim YJ, Kwon S, Lee Y, Choi SY, Park J, et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep* 2009 May 31;42(5):265-70.
- Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Yu DF, et al. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin Cancer Res* 1999 Apr;5(4):891-7.
- Li C, Wallace S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 May 22;60(8):886-98.
- Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Novel therapeutic approaches for targeting tumor angiogenesis. *Anticancer Res* 2012 Jan;32(1):1-12.
- Liotta LA, Rao CN. Tumor invasion and metastasis. *Monogr Pathol* 1986;(27):183-92.
- Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007 Feb 1;329(1-2):1-11.
- Lorin A., Flore C, Thomas A., Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol Agron Soc Environ* 2004;8(3):163-76.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007;25:619-47.

M

- Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2009 Mar;59(2):111-37.
- Ma Y, Yang Q, Wang L, Zhou X, Zhao Y, Deng Y. Repeated injections of PEGylated liposomal topotecan induces accelerated blood clearance phenomenon in rats. *Eur J Pharm Sci* 2012 Apr 11;45(5):539-45.
- MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA, et al. Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery* 2001 Jan;48(1):151-7.
- Mace E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* 2011 Aug;8(8):662-4.

- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000 Mar 1;65(1-2):271-84.
- Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* 2001;41:189-207.
- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2009 Nov;30(11):592-9.
- Maldiney T, Richard C, Seguin J, Wattier N, Bessodes M, Scherman D. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano* 2011 Feb 22;5(2):854-62.
- Malik N, Evagorou EG, Duncan R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 1999 Sep;10(8):767-76.
- Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* 2010 Dec;10(10):753-68.
- Masson C, Garinot M, Mignet N, Wetzer B, Mailhe P, Scherman D, et al. pH-sensitive PEG lipids containing orthoester linkers: new potential tools for nonviral gene delivery. *J Control Release* 2004 Oct 19;99(3):423-34.
- Mayhew EG, Goldrosen MH, Vaage J, Rustum YM. Effects of liposome-entrapped doxorubicin on liver metastases of mouse colon carcinomas 26 and 38. *J Natl Cancer Inst* 1987 Apr;78(4):707-13.
- McConville P, Elliott WL, Kreger A, Lister R, Moody JB, Trachet E, et al. Preclinical Models of Tumor Growth and Response
- In Vivo Imaging of Cancer Therapy. In: Shields AF, Price P, editors. Humana Press; 2007. p. 13-32.
- McKeage MJ, Baguley BC. Disrupting established tumor blood vessels: an emerging therapeutic strategy for cancer. *Cancer* 2010 Apr 15;116(8):1859-71.
- Mignet N, Cadet M., Bessodes M, Scherman D. Incorporation of Poly(Ethylene Glycol) Lipid into Lipoplexes: On-Line Incorporation Assessment and Pharmacokinetics Advantages. In: Gregoriadis G, editor. *Liposome Technology*, 3rd edition, 2007. 2007. p. 273-92.
- Minaguchi J, Ohashi T, Inagawa K, Ohtsuka A, Ninomiya Y. Transvascular accumulation of Sialyl Lewis X conjugated liposome in inflamed joints of collagen antibody-induced arthritic (CAIA) mice. *Arch Histol Cytol* 2008 Nov;71(3):195-203.
- Miteva MA, Violas S, Montes M, Gomez D, Tuffery P, Villoutreix BO. FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Res* 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W738-W744.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001 Jun;53(2):283-318.
- Mohanty C, Das M, Kanwar JR, Sahoo SK. Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy. *Curr Drug Deliv* 2011 Jan;8(1):45-58.
- Muller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Muller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol* 2002 Jun;72(3):221-9.
- Myrset AH, Fjerdingsstad HB, Bendiksen R, Arbo BE, Bjerke RM, Johansen JH, et al. Design and characterization of targeted ultrasound microbubbles for diagnostic use. *Ultrasound Med Biol* 2011 Jan;37(1):136-50.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004 Sep;4(9):665-76.

Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di FF, et al. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997 Apr 15;57(8):1554-60.

Nelson H, Ramsey PS, Donohue JH, Wold LE. Cell adhesion molecule expression within the microvasculature of human colorectal malignancies. *Clin Immunol Immunopathol* 1994 Jul;72(1):129-36.

New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC, editor. *Liposomes-A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1990. p. 33-104.

O

O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 1997;79:273-94.

Ott PA, Adams S. Small-molecule protein kinase inhibitors and their effects on the immune system: implications for cancer treatment. *Immunotherapy* 2011 Feb;3(2):213-27.

P

Pahlsson P, Strindhall J, Srinivas U, Lundblad A. Role of N-linked glycosylation in expression of E-selectin on human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1995 Sep;25(9):2452-9.

Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 2006 May;44(5):265-74.

Park JH, Lee S, Kim JH, Park K, Kim K, Kwon IC. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science* 2008 Jan;33(1):113-37.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007 Dec;2(12):751-60.

Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006 Aug 7;25(34):4633-46.

Pocard M, Tsukui H, Salmon RJ, Dutrillaux B, Poupon MF. Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In Vivo* 1996;10(5).

Polin L, Corbett TH, Roberts BJ, Lawson AJ, Leopold WR, White K, et al. Transplantable Syngeneic Rodent Tumors: Solid Tumors in Mice. *Tumors models in cancer research, Cancer Drug Discovery and Development*. Second ed. Teicher BA ed. New York: Springer Science & Business Media LLC; 2011. p. 43-78.

Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, et al. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2001 Dec 17;11(24):3095-7.

Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 2004 Sep;97(3):1119-28.

Q

Qin L, Bromberg-White JL, Qian CN. Opportunities and challenges in tumor angiogenesis research: back and forth between bench and bed. *Adv Cancer Res* 2012;113:191-239.

R

- Ragelle H, Crauste-Manciet S, Seguin J, Brossard D, Scherman D, Arnaud P, et al. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *Int J Pharm* 2012 May 10;427(2):452-9.
- Reardon DA, Cheresch D. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer* 2011 Dec;2(12):1159-65.
- Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2000 Nov;2(6):491-5.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003 Jul;23(4):519-34.
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002 Jan;8(1):27-34.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995 Apr;22(4):375-83.
- Rodriguez JO, Moraes AM. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant. *Chem Eng Technol* 2010;33:15-20.
- Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999 Aug;80(11):1697-707.
- Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, et al. Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol* 2004 Oct;122(4):598-609.
- Roux M, Perly B, Djedaini-Pilard F. Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins. *Eur Biophys J* 2007 Nov;36(8):861-7.

S

- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, et al. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 2000 Jan;20(1A):271-7.
- Sakhalkar HS, Dalal MK, Salem AK, Ansari R, Fu J, Kiani MF, et al. Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 23;100(26):15895-900.
- Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res* 2006 Apr 1;66(7):3351-4, discussion.
- Schiffelers RM, Koning GA, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, et al. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J Control Release* 2003 Aug 28;91(1-2):115-22.
- Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012 Apr;12(4):278-87.
- Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El GF, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 2009 Nov;10(11):1033-4.
- Sen A, Capitano ML, Sperryak JA, Schueckler JT, Thomas S, Singh AK, et al. Mild elevation of body temperature reduces tumor interstitial fluid pressure and hypoxia and enhances efficacy of radiotherapy in murine tumor models. *Cancer Res* 2011 Jun 1;71(11):3872-80.

- Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Kotliansky VE, de Fougerolles AR, Detmar M. The $\alpha(1)\beta(1)$ and $\alpha(2)\beta(1)$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2002 Jan;160(1):195-204.
- Shamay Y, Paulin D, Ashkenasy G, David A. Multivalent display of quinic acid based ligands for targeting E-selectin expressing cells. *J Med Chem* 2009 Oct 8;52(19):5906-15.
- Sherman MR, Williams LD, Sobczyk MA, Michaels SJ, Saifer MG. Role of the methoxy group in immune responses to mPEG-protein conjugates. *Bioconj Chem* 2012 Mar 21;23(3):485-99.
- Shi YQ, Fukai T, Sakagami H, Chang WJ, Yang PQ, Wang FP, et al. Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mongolica*. *J Nat Prod* 2001 Feb;64(2):181-8.
- Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 2006 Nov;28(11):1779-802.
- Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* 2012 Feb;17(3-4):160-6.
- Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000 Oct 27;103(3):467-79.
- Soria J. Angiogenèse tumorale : anti-angiogéniques, vasculotoxiques, ou les deux ? *VEGF Actu* 2012;26.
- Spragg DD, Alford DR, Greferath R, Larsen CE, Lee KD, Gurtner GC, et al. Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Aug 5;94(16):8795-800.
- Steinbauer M, Guba M, Cernaianu G, Kohl G, Cetto M, Kunz-Schughart LA, et al. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(2).
- Stoclet JC, Schini-Kerth V. [Dietary flavonoids and human health]. *Ann Pharm Fr* 2011 Mar;69(2):78-90.
- Stupack DG. The biology of integrins. *Oncology (Williston Park)* 2007 Aug;21(9 Suppl 3):6-12.
- Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis* 2009 Feb;30(2):300-7.
- Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 Dec 14;57(15):2106-29.
- Syed DN, Afaq F, Maddodi N, Johnson JJ, Sarfaraz S, Ahmad A, et al. Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/beta-catenin signaling and decreased Mitf levels. *J Invest Dermatol* 2011 Jun;131(6):1291-9.

T

- Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, et al. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res* 1993 Jan 15;53(2):354-61.
- Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, Deffieux T, Gennisson JL, Montaldo G, et al. Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity: initial clinical results using supersonic shear imaging. *Ultrasound Med Biol* 2008 Sep;34(9):1373-86.

- Thompson B, Mignet N, Hofland H, Lamons D, Seguin J, Nicolazzi C, et al. Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery. *Bioconjug Chem* 2005 May;16(3):608-14.
- Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 2000 Oct;11 Suppl 2:S81-S91.
- Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *Aaps J* 2007;9(2).
- Touil YS, Fellous A, Scherman D, Chabot GG. Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr Cancer* 2009;61(3):310-21.
- Touil YS, Auzeil N, Boulinguez F, Saighi H, Regazzetti A, Scherman D, et al. Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite. *Biochemical Pharmacology* 2011a;82:1731-9.
- Touil YS, Seguin J, Scherman D, Chabot GG. Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011b Aug;68(2):445-55.
- Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005 Jun;5(6):423-35.
- Trapani G, Denora N, Trapani A, Laquintana V. Recent advances in ligand targeted therapy. *J Drug Target* 2012 Jan;20(1):1-22.

V

- Van Bruggen N., Syha J, Busza AL, King MD, Stamp GW, Williams SR, et al. Identification of tumor hemorrhage in an animal model using spin echoes and gradient echoes. *Magn Reson Med* 1990 Jul;15(1):121-7.
- Van Sluis R., Bhujwalla ZM, Raghunand N, Ballesteros P, Alvarez J, Cerdan S, et al. In vivo imaging of extracellular pH using 1H MRSI. *Magn Reson Med* 1999 Apr;41(4):743-50.
- Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995 Jul;70(2):95-111.
- Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36(2):119-26.

W

- Wachstein M, Meisel E. Demonstration of Peroxidase Activity in Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* 1964;12.
- Wai PY, Mi Z, Guo H, Sarraf-Yazdi S, Gao C, Wei J, et al. Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis* 2005 Apr;26(4):741-51.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999 Oct;35(10):1517-25.
- Wang X, Ishida T, Kiwada H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 2007 Jun 4;119(2):236-44.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000 Jul 15;60(14):3823-31.

- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary Flavone Is a Potent Apoptosis Inducer in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2000 Jul 1;60(14):3823-31.
- Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 Dec;4(12):938-47.
- Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD, Fidler IJ. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992 Aug 19;52(1):98-104.
- Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992 Aug 14;1113(2):171-99.
- Wu J, Liu P, Zhu JL, Maddukuri S, Zern MA. Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficacy by labeling with asialofetuin in rodents. *Hepatology* 1998 Mar;27(3):772-8.
- Y**
- Yan X, Scherphof GL, Kamps JA. Liposome opsonization. *J Liposome Res* 2005;15(1-2):109-39.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001;21:381-406.
- Ye C, Kiriyaama K, Mistuoka C, Kannagi R, Ito K, Watanabe T, et al. Expression of E-selectin on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1995 May 16;61(4):455-60.
- Ye Y, Chen X. Integrin targeting for tumor optical imaging. *Theranostics* 2011;1:102-26.
- Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* 1999a Sep;19(5B):4297-303.
- Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999b Apr;9(4):369-76.
- Ying TH, Yang SF, Tsai SJ, Hsieh SC, Huang YC, Bau DT, et al. Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8/-caspase-3-dependent pathway. *Arch Toxicol* 2012 Feb;86(2):263-73.
- Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. *Alcohol* 2005 Apr;35(3):175-85.
- Yoshikawa N, Sakamoto K, Mizuno S, Sakaguchi J, Miyamoto H, Mine T, et al. Multiple components in serum contribute to hepatic transgene expression by lipoplex in mice. *J Gene Med* 2011 Nov;13(11):632-43.
- Young JS, Lumsden CE, Stalker AL. The significance of the tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *J Pathol Bacteriol* 1950 Jul;62(3):313-33.
- Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, Yang HS, et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res* 2006;12(10).

Z

- Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998;49:407-24.
- Zheng X, Goins BA, Cameron IL, Santoyo C, Bao A, Frohlich VC, et al. Ultrasound-guided intratumoral administration of collagenase-2 improved liposome drug accumulation in solid tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011 Jan;67(1):173-82.

Sites internet : dernière consultation août-septembre 2012

- **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 :**

<http://globocan.iarc.fr/>

- **Institut National du Cancer : INCa Agence nationale sanitaire en cancérologie**

<http://www.e-cancer.fr/>

Epidémiologie des cancers - Données essentielles en France métropolitaine- (INCa)
<http://lesdonnees.e-cancer.fr>

- **National Cancer Institute**

<http://www.cancer.gov/>

NCI Drug Dictionary

<http://www.cancer.gov/drugdictionary>

- **U.S. Food and Drugs administration**

<http://www.fda.gov/>

- **ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health**

<http://clinicaltrials.gov/>

- **American Cancer Society**

<http://www.cancer.org/>

- **RadiologyInfo - The radiology information resource for patients**

<http://www.radiologyinfo.org>

- **University of Maryland Medical Center**

<http://www.umm.edu/imagepages/1168.htm>

- **Objectifs nationaux rédigés par les membres de la collégiale des universitaires en Hépatogastroentérologie - Version 2006**

<http://www.snfge.asso.fr/05-Interne-Chercheurs/OB-internes-etudiants/objectifs/publication4/259.htm>

- **Nuclear Physics SH2302**

<http://www.nuclear.kth.se/courses/nucphys/SH2302.htm>

- **Medscape education**

<http://www.medscape.org/viewarticle/551140>

- **My Vision Test**

A free modern Amsler Grid test for Macular Degeneration

<http://www.myvisiontest.com>

- **Centre du Cancer Lausanne**

<http://www.cancer-chuv.ch>

ANNEXES

Colon Tumor Growth and Antivascular Treatment in Mice: Complementary Assessment with MR Elastography and Diffusion-weighted MR Imaging¹

Lauriane Jugé, MSc
 Bich-Thuy Doan, PhD
 Johanne Seguin, MSc
 Miguel Albuquerque, MSc
 Benoît Larrat, PhD
 Nathalie Mignet, PhD
 Guy G. Chabot, PhD
 Daniel Scherman, PhD
 Valérie Paradis, MD, PhD
 Valérie Vilgrain, MD, PhD
 Bernard E. Van Beers, MD, PhD
 Ralph Sinkus, PhD

¹From the Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon (CRB3) INSERM UMR 773, 100 boulevard Général Leclerc, 92110 Clichy, France (L.J., M.A., V.P., V.V., B.E.V.B., R.S.); UPGI/Chimie-ParisTech, CNRS UMR8151, INSERM U1022, Université Paris Descartes, Department of Chemical Pharmacology, Genetics, and Imaging, Paris, France (B.T.D., J.S., N.M., G.G.C., D.S.); ESPCI-ParisTech, CNRS UMR 7587 Institut Langevin, Paris, France (B.L.); Department of Pathologic Anatomy, Hôpital Beaujon, Assistance Publique, Université Paris Diderot, Clichy, France (V.P.); and Department of Radiology, Hôpital Beaujon, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Clichy, France (V.V., B.E.V.B.). Received July 24, 2011; revision requested September 7; final revision received November 21; accepted December 13; final version accepted February 23, 2012. Supported in part by INSERM grant U773 and the National Cancer Institute of France. Address correspondence to L.J. (e-mail: lauriane.juge@inserm.fr).

© RSNA, 2012

Purpose:

To investigate the potential value of magnetic resonance (MR) elastography and diffusion-weighted (DW) MR imaging in the detection of microstructural changes of murine colon tumors during growth and antivascular treatment.

Materials and Methods:

The study was approved by the regional ethics committee for animal care. Sixty Balb-C mice, bearing ectopic and orthotopic colon tumors, were monitored for 3 weeks with high-resolution T2-weighted MR imaging, three-dimensional steady-state MR elastography, and DW MR imaging at 7 T. The same imaging protocol was performed 24 hours after injection of combretastatin A4 phosphate (CA4P) in 12 mice. The absolute value of the complex shear modulus ($|G^*|$) and the apparent diffusion coefficient (ADC) were measured in the viable zones of tumors and compared with microvessel density (MVD), cellularity, and micronecrosis by using the Pearson correlation coefficient.

Results:

During tumor growth, $|G^*|$ increase was correlated with MVD ($r = 0.70$ [$P = .08$] and $r = 0.78$ [$P = .002$], for both the ectopic and orthotopic models, respectively). Moreover, the ectopic tumors displayed decreased ADC, which correlated with increased cellularity ($r = 0.77$, $P = .04$), whereas no changes in ADC and cellularity were observed in orthotopic tumors. After CA4P administration, $|G^*|$ decreased in the ectopic model ($P < .0001$), similar to the MVD evolution ($P = .03$), whereas no significant changes in $|G^*|$ ($P = .7$) and MVD ($P = .6$) were observed in the orthotopic model. ADC increased in both models ($P = .047$ and $P = .01$ for the ectopic and the orthotopic models, respectively) in relation to increased micronecrosis.

Conclusion:

Imaging of mechanical properties and diffusivity provide complementary information during tumor growth and regression that are respectively linked to vascularity and tumor cell alterations, including cellularity and micronecrosis.

© RSNA, 2012

Supplemental material: <http://radiology.rsna.org/lookup/suppl/doi:10.1148/radiol.12111548/-/DC1>

The follow-up of the alterations in vascularity and cellularity during tumor growth and regression are of fundamental importance in the diagnosis, the determination of prognosis, and the evaluation of cancer treatment (1–3). In colon cancer, the researchers in one analysis (4) confirmed that mean vessel density (MVD) is a biomarker of tumor aggressiveness and prognosis. Moreover, the current treatment of colorectal cancer consists of combining antiangiogenic therapy and cytotoxic chemotherapy (5). Therefore, a precise evaluation of tumor vascularization and cellularity is of major importance

Advances in Knowledge

- MR elastography allowed monitoring of changes in vascularization; absolute value of the complex shear modulus ($|G^*|$) and mean vessel density (MVD), as established from CD31 staining, showed a substantial increase when the tumor switched from its early stage (for $|G^*|$, $4.0 \text{ kPa} \pm 0.6$ [standard deviation] and $4.8 \text{ kPa} \pm 0.4$ and, for MVD, $224 \text{ mm}^{-2} \pm 16$ and $258 \text{ mm}^{-2} \pm 17$ for the ectopic and orthotopic models, respectively) to its angiogenic stage (for $|G^*|$, $6.6 \text{ kPa} \pm 0.8$ and $6.1 \text{ kPa} \pm 1.2$ and, for MVD, $299 \text{ mm}^{-2} \pm 37$ and $358 \text{ mm}^{-2} \pm 46$ for the ectopic and orthotopic models, respectively).
- Diffusion-weighted (DW) MR imaging was sensitive to tumor cell alterations, including cellularity and micronecrosis; apparent diffusion coefficient (ADC) decreased significantly ($P = .004$) for the ectopic model between early ($[0.67 \pm 0.06] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$) and angiogenic ($[0.52 \pm 0.05] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$) stages, whereas no significant ADC change ($P = .17$) was observed for the orthotopic model between these stages ($[0.60 \pm 0.08] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ vs $[0.61 \pm 0.02] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$).

for diagnosis and treatment follow-up. Some insight into these features can be obtained with quantitative magnetic resonance (MR) imaging, including diffusion-weighted (DW) MR imaging and dynamic contrast material-enhanced MR imaging (6). It has been shown that DW MR imaging, which is based on the diffusivity of water, is correlated with tissue architecture, including cell density and necrosis (7). Dynamic contrast-enhanced MR imaging provides quantitative information about tumor perfusion and permeability. However, the perfusion information is not directly correlated to MVD, because often tumor vessels are nonfunctional (8).

MR elastography is a newer quantitative MR imaging method that provides information about the mechanical properties of tissue (9–11). Our hypothesis is that alterations of the vasculature induce substantial changes in the viscoelastic properties of tissue that can be probed with MR elastography. Therefore, the aim of our study was to assess the potential value of combined MR elastography and DW MR imaging in the detection of microstructural changes of murine colon tumors during growth and antivascular treatment for two models of implantation (ectopic and orthotopic). Although the use of animal tumor models allowed us to obtain clinically relevant data, the growth and the inhibition of a tumor implanted in the subcutaneous tissue may be different from a tumor residing in visceral organs after administration of an antivascular compound. In this study, we used these different properties to create different tumor responses to investigate the potential value of MR elastography and DW MR imaging in the detection of microstructural changes of murine colon tumors during growth and antivascular treatment (12).

Implication for Patient Care

- MR elastography and DW MR imaging have the potential of being complementary for noninvasive surveillance of tumor evolution.

Materials and Methods

Colon Mouse Tumor Model

The study was approved by the Regional Ethics Committee for Animal Care Paris 1 (no. 200560002). Sixty 8-week-old female Balb-C mice with a mean weight of 20 g (Janvier, Saint Genest de l'Isle, France) were implanted with CT26 tumor fragment (3 mm^3) (13–16) either subcutaneously into the flank ($n = 24$, ectopic model) or into the cecum wall ($n = 24$, orthotopic model) by a PhD student (J.S.). The orthotopic model is considered as a realistic model due to its matching host environment (12,17). Angiogenesis recruits new blood vessels from the superficial cecum.

The CT26 cell line (ATCC; LGC standards, Molsheim, France) originated from an undifferentiated chemically induced colon carcinoma. After implantation, the growth of the tumor was imaged at day 5 for the ectopic model and at day 7 for the orthotopic model (denoted as early stage), on day 11 (intermediate angiogenic stage), and on days 14 and 18 (late angiogenic stages). For both models,

Published online before print

10.1148/radiol.12111548 Content code: GI

Radiology 2012; 264:436–444

Abbreviations:

ADC = apparent diffusion coefficient
CA4P = combretastatin A4 phosphate
 $|G^*|$ = complex shear modulus
DW = diffusion weighted
MVD = mean vessel density
ROI = region of interest
2D = two-dimensional

Author contributions:

Guarantors of integrity of entire study, L.J., B.T.D., M.A., G.G.C., V.V., R.S.; study concepts/study design or data acquisition or data analysis/interpretation, all authors; manuscript drafting or manuscript revision for important intellectual content, all authors; approval of final version of submitted manuscript, all authors; literature research, L.J., B.T.D., J.S., B.L., N.M., G.G.C., D.S., V.P., B.E.V.B.; clinical studies, L.J., B.T.D., N.M., V.P.; experimental studies, L.J., B.T.D., J.S., M.A., B.L., N.M., G.G.C., D.S., V.P., R.S.; statistical analysis, L.J., B.T.D., J.S., N.M., G.G.C., D.S., V.P., R.S.; and manuscript editing, L.J., B.T.D., J.S., B.L., N.M., G.G.C., D.S., V.P., V.V., B.E.V.B., R.S.

Potential conflicts of interest are listed at the end of this article.

six mice were imaged at each stage and sacrificed for tumor histologic analysis.

Combretastatin A4 Phosphate Treatment

Combretastatin A4 phosphate (CA4P) is a tumor vascular-targeting agent (18,19). It depolymerizes the microtubule of endothelial cells, resulting in a cell membrane blebbing. This alteration of the endothelium induces change in the blood vessel by a contraction of the vascular lumen until a vascular obstruction occurs, hence increasing the vascular resistance to blood flow. Moreover, fosbretabulin disodium destroys the adhesion between cells of the wall of the blood vessel, leading to an increase in vascular permeability. Both phenomena lead to rapid vascular shutdown and a reduction in tumor viable cells.

Twelve additional mice (six with ectopic tumors and six with orthotopic tumors) were injected intraperitoneally with 100 mg/kg of CA4P disodium salt (Toroma Organics, Saarbrücken, Germany) dissolved in sterile saline, 10 days after the implantation of CT26 fragments by the same PhD student who implanted the tumors. Imaging was performed 24 hours after CA4P injection. Maximum induction of tumor necrosis after treatment with CA4P occurs at this time. Extensive tumor necrosis was readily apparent, with only a thin layer of viable tissue remaining at the rim. At later times, cells surviving at the periphery repopulated the tumor, both by infiltrating the surrounding normal tissue and by replacing the previously necrotic areas of the tumor (20).

MR Acquisition and Data Analysis

MR imaging was performed by a PhD student (L.J.) and two clinicians (B.T.D., R.S.) with a horizontal 7-T imaging unit (Pharmascan; Bruker, Erlangen, Germany) equipped with a 1-H birdcage radio-frequency probe of 31-mm inner diameter. Mice were in the prone position, with the tumor pressed against a semicurved plastic piston. An electromagnetic shaker (Brüel & Kjær, Nærum, Denmark) located outside the MR unit was used to transmit mechanical vibrations through a flexible carbon fiber rod to the piston (Fig E1 [online]). The horizontal vibrations of

the shaker and the rod were converted into vertical vibrations through a cantilever. Gas anesthetic (1% isoflurane [Baxter S.A.S., Maurepas, France] in a 1:2 ratio of oxygen to air mixture flowing at 1 L/min) was administered to the mice through a face mask.

Each mouse underwent imaging with a protocol including the following sequences (all acquired with free breathing of the animal). First, a two-dimensional (2D) fast low-angle shot anatomic sequence was applied to localize the center of the tumor. The following imaging parameters were used: repetition time msec/echo time msec, 350/3.8; number of signals acquired, four; number of repetitions, one; number of contiguous transverse sections, 30; section thickness, 0.8 mm; field of view, 40×40 mm; matrix size, 192×192 ; and total acquisition time, 3 minutes 21 seconds.

High-resolution 2D T2-weighted images were obtained thereafter for an accurate depiction of the anatomy by using a rapid acquisition with relaxation enhancement sequence with the following parameters: 2454/14; rapid acquisition with relaxation enhancement factor, eight; effective echo time, 56 msec; number of signals acquired, 24; number of repetitions, one; number of contiguous transverse sections, five; section thickness, 0.6 mm; field of view, 15.8×15.8 mm; matrix size, 128×128 ; for a high plane-resolution, 123×123 μ m; and total acquisition time, 15 minutes 42 seconds.

A steady-state MR elastography sequence was applied with a mechanical excitation frequency of 1000 Hz. This sequence provided volumetric images of the three-dimensional propagating mechanical wave inside the tumor. It consisted of a modified 2D multisection spin-echo sequence with additional sinusoidal motion-sensitizing gradients (maximum amplitude, 300 mT/m) attached consecutively to each gradient axis synchronized to the mechanical excitation (21,22). The acquisition was repeated for each gradient direction, with the following parameters: 1001/27; number of signals acquired, two; number of repetitions,

eight; number of contiguous transverse sections, 10; section thickness, 0.3 mm; field of view, 15.8×15.8 mm; and matrix size, 64×64 . Eight times were equally distributed over one period to sample the sinusoidal motion, resulting in a 17-minute 5-second acquisition time for each motion direction. Hence, total acquisition time was 51 minutes 15 seconds (23).

Finally, quantitative apparent diffusion coefficient (ADC) maps were acquired by using a 2D spin-echo diffusion sequence with the following parameters: 2500/34; four *b* values (250, 500, 750, and 1000 sec/mm²); number of contiguous transverse sections, five; section thickness, 0.6 mm; field of view, 15.8×15.8 mm; matrix size, 64×64 ; and total acquisition time, 12 minutes 12 seconds.

High-resolution T2-weighted MR elastography and spin-echo diffusion sections had the same localization and were positioned in the center of the tumor. Total acquisition time for the entire protocol was approximately 2 hours per mouse.

From the MR elastography data, the complex shear modulus ($|G^*|$) was calculated in each voxel by solving the wave equation (22,24), as follows:

$$-\rho\omega^2\bar{q} = G^* \nabla^2 \bar{q}, \quad \bar{q} = \bar{\nabla} \cdot \bar{u} \in C^3,$$

where ρ is the density of material, ω is the circular velocity, $\bar{q}$ is the curl of the displacement field, $\bar{u}$ the complex-valued displacement vector, ∇^2 is the Laplacian operator, and G^* is the complex shear modulus independent of the wave amplitude in the linear and small amplitude regimen. Data were considered as reliable if the local total wave amplitude was greater than 0.3 μ m. This value corresponds to three times the total amplitude of the noise level at 7 T (ie, 0.1 μ m) as established from regions within the mouse to where no mechanical wave managed to penetrate (Fig 1).

ADCs, corresponding to the pure diffusion coefficient, were obtained through a pixelwise monoexponential fit to the data points for the *b* value range from 250 to 1000 sec/mm² (25). Mean $|G^*|$ and ADC values were calculated

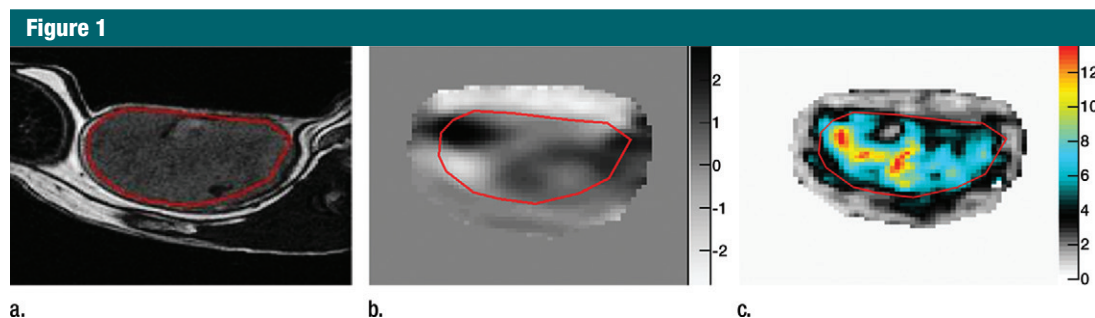


Figure 1: Ectopic tumor (red region of interest [ROI]). (a) T2-weighted image depicts the anatomy (2454/54 [effective]), (b) unwrapped phase image of the MR elastography acquisition shows wave propagation at 1000 Hz in the tumor (size on bar at right is in micrometers), and (c) map of $|G^*|$ (in kilopascals) depicts the mechanical properties.

within ROIs manually drawn and positioned inside the viable zone of the tumor, which was defined as the isointense area (T2 was between 46 and 53 msec, and the surface area was approximately 60%–80% of the entire tumor area) on the rapid acquisition with relaxation enhancement images (26) (Fig 2), obtained by a PhD student (L.J.). Data analysis was performed on the area of ROIs recorded for each measurement. The 2D fast low-angle shot sequence was used for tumor volume assessment. This sequence covers the entire volume of tumor. With the software package ImageJ, ROIs were drawn on the tumoral boundaries on each section where the tumor was identified. The area of each ROI section (in square millimeters) was multiplied by the thickness of the section (0.8 mm) to calculate the volume (in cubic millimeters) of each section. To obtain the total volume of the tumor (in cubic millimeters), all volumes for each section were added.

Histologic Analysis

Mice were sacrificed directly after MR data acquisition, and the tumors were harvested for histologic analysis, performed by a PhD student (L.J.), an engineer (M.A.), and a clinician (V.P.). Six mice were sacrificed at each time for the ectopic and the orthotopic model (ie, 48 mice in total). Moreover, 12 treated mice were also sacrificed as soon as the MR imaging was performed. Immediately after resection, the tumors were frozen in nitrogen-cooled isopentane, and 10- μ m-thick sections were cut in the regions that had been

imaged previously. Because our study was focused on microscopic changes in the tumors, histologic analysis was performed on the viable rim to exclude complicating effects originating from macroscopic necrotic areas. Cell density by using cell counting and percentage of micronecrosis and interstitial stroma were determined on hematoxylin-eosin-stained sections. Immunostaining with CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) purified rat antimouse monoclonal antibody (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) and KI67 rabbit antimouse monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, Mass) was performed to assess MVD (28) and tumor proliferation (29). Microscopic examination was performed with a visible light microscope (Leica DMRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and data were analyzed with ImageJ.

Staining with hematoxylin-eosin, CD31, and KI67 was performed on each tumor. Sections were cut such as their orientation coincided with the section positioning of the MR protocol. Serial sections were prepared for each staining. Cell counts, evaluation of MVD, and tumor proliferation were manually assessed on hot-spot areas (original magnification, $\times 200$), which were part of the viable tumor zone.

To assess tumor perfusion, two additional groups (ectopic and orthotopic implantation) of six treated and six control mice were injected at day 11 intravenously with 100 μ L of a blue fluorescent dye solution (Hoechst 33342; Molecular Probes, Eugene, Ore), 10 mg/kg

dissolved in saline, and were sacrificed 1 minute later to quantify the perfused tumor zones with fluorescence microscopy (Axiophot; Zeiss, Wetzlar, Germany) equipped with a camera (Retiga 2000; Q Imaging, Surrey, Canada) (30). Perfused zones were quantified by using ImageJ (17) on eight photographs of each experimental condition. Neither any further histologic analysis nor any MR imaging was performed in these two groups.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by a PhD student (L.J.). Results are presented as means $\pm$ standard deviations. Comparisons between groups were performed with the unpaired *t* test. The results obtained at 11, 14, and 18 days during tumor growth were compared with those obtained at the early stage for both models. The treated groups were compared with the control group on day 11. The $|G^*|$ and ADC were correlated with MVD and cellularity (using the Pearson correlation coefficient). Differences in evolution with *P* values of less than .05, .01, and .001 were considered to be significant. Statistical analysis was performed with software (SPSS, version 17; SPSS, Chicago, Ill) by using two-sided tests with unpaired and unequal variances.

Results

MR Imaging during Tumor Growth

The characteristic evolution of the ectopic model is shown in Figure 3. High-resolution anatomic T2-weighted MR images

Figure 2

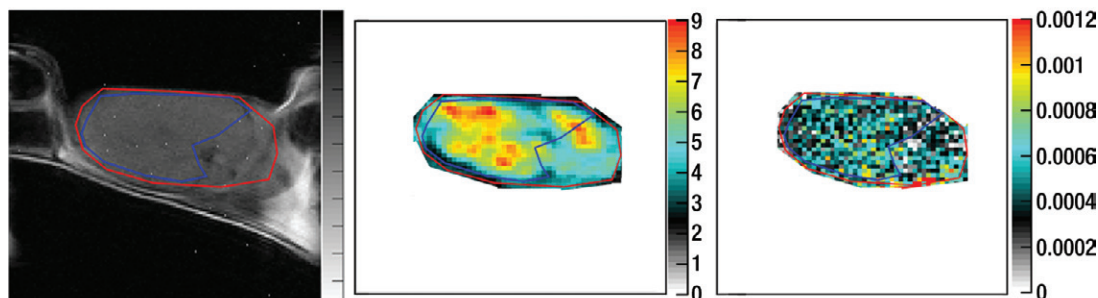


Figure 2: Ectopic tumor at day 11 (red ROI). **(a)** High-resolution T2-weighted image (rapid acquisition relaxation enhancement sequence). At this time, tumor homogeneity starts to degrade because of onset of hemorrhagic necrosis (hypointense signal). To exclude any confounding effects from necrotic processes, further analysis was restricted to the viable zone only (blue ROI). **(b, c)** Corresponding maps of **(b)** $|G^*|$ (in kilopascals) and **(c)** ADC (in square millimeters per second). On **c**, the apparent decrease in the ADC within the necrotic area of the tumor compared with the viable zone is probably caused by the presence of hemorrhage, as noted by some researchers (27).

Growth Evolution of Colon Tumors Measured with MR Imaging after Tumor Inoculation

CT26 Implantation	Day 5 or 7	Day 11	Day 14	Day 18
Ectopic	27 ± 10	768 ± 238	950 ± 269	3404 ± 1085
Orthotopic	270 ± 101	972 ± 484	2014 ± 638	3749 ± 814

Note.—The fast low-angle shot sequence was used. Data are mean tumor volume in cubic millimeters ± standard deviations.

(Fig 3, top) and optical images (Fig 3, bottom) of the tumors confirm a specific growth pattern: Initially, at day 5, the tumor is in its primitive early stage; at day 11, the tumor has entered its angiogenic stage, as confirmed by the installation of new blood vessels at the interface between the tumor and the host tissue; and at day 18, we observe the presence of necrosis inside the still-vascularized tumor (hypointense signal on the T2-weighted MR images). Results are similar for the orthotopic model.

The growth evolution of the colon tumors was monitored by using a fast low-angle shot sequence to measure the entire volume of the tumor, and the data are presented in the Table. Obviously, the tumors implanted on the cecum (orthotopic) grew faster than the ectopic tumors because of the specific environment and favorable local growth factors. Photographs taken after extraction of the tumors confirmed the trend for both implantations (14).

The mean measurements of $|G^*|$ showed a significant increase in the mechanical properties when the tumor switched from its early stage ($4.0 \text{ kPa} \pm 0.6$ [standard deviation] and $4.8 \text{ kPa} \pm 0.4$ for the ectopic and orthotopic models, respectively) to its angiogenic stage ($6.6 \text{ kPa} \pm 0.8$ and $6.1 \text{ kPa} \pm 1.2$ for the ectopic and the orthotopic models, respectively), with P values of .002 and .0004 for ectopic and orthotopic models, respectively, for significant evolution of $|G^*|$. Mean ADC decreased significantly for the ectopic model between the early ($[0.67 \pm 0.06] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$) and the angiogenic ($[0.52 \pm 0.05] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$; $P = .004$) stages, whereas no significant mean ADC changes were observed for the orthotopic model ($[0.60 \pm 0.08] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ vs $[0.61 \pm 0.02] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$; $P = .17$) (Fig 4).

Histologic Analysis during Tumor Growth

Histologic analysis showed that the tumor stroma was poorly represented and

accounted for less than 10% of the overall tumoral cross-sectional area (treated or not treated). The viable tumor areas were densely cellular. The growth evolution of the ectopic model was characterized by the following stages: **(a)** At day 11, a less cohesive zone appeared in the center; **(b)** at day 14, the central necrotic zone occupied less than 10% of the tumor area and was encompassed by a rim of edema ($< 20\%$ of the tumor area); and **(c)** at day 18, the necrotic area increased substantially to 30%–40%. In regard to the growth pattern of the orthotopic model, the evolution was similar to that of the ectopic model. However, a difference in the distribution of necrosis was observed. Necrosis was restricted to the central area in the ectopic model and was composed of multiple, randomly distributed areas in the orthotopic model.

The faster growth for the orthotopic model was confirmed by measuring the fraction of proliferative cells. This fraction increased from a mean of 0.29 ± 0.03 (day 5) to a mean of 0.40 ± 0.04 for the later stages in the ectopic model, whereas mean values of 0.50 ± 0.06 (day 5) and then 0.40 ± 0.09 (later stages) were obtained for the orthotopic implantation.

The mean MVD obtained from CD31 staining increased significantly between the early stage at day 5 ($224 \text{ mm}^{-2} \pm 16$ and $258 \text{ mm}^{-2} \pm 17$ for the ectopic and orthotopic models,

Figure 3

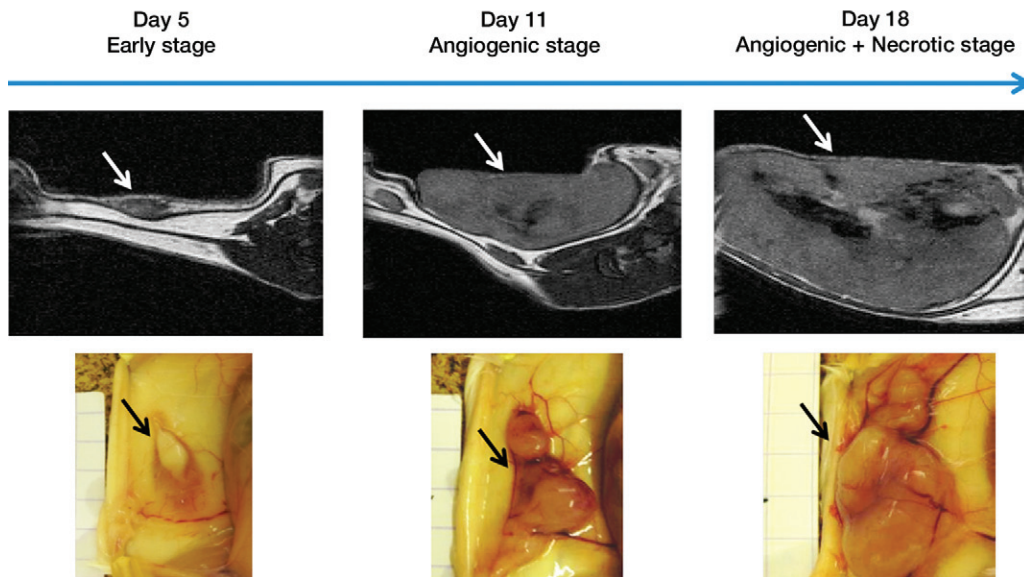


Figure 3: Growth evolution of an ectopic CT26 tumor. Top: T2-weighted MR images. Bottom: Optical images of the tumors. MR and optical images confirm a specific growth pattern: Initially at day 5, the tumor (arrows) is in its primitive early stage; at day 11, the tumor has entered its angiogenic stage, as confirmed by the installation of new blood vessels at the interface between the tumor and the host tissue; and at day 18, we observed the presence of necrosis inside the still-vascularized tumor (hypointense signal on the T2-weighted MR images). Results are similar for the orthotopic model.

respectively) and the intermediate stage at day 11 ($299 \text{ mm}^{-2} \pm 37$ and $358 \text{ mm}^{-2} \pm 46$ for the ectopic and the orthotopic models, respectively), with P values of .003 and .006 for the ectopic and orthotopic models, respectively, for the significant evolution of MVD. In regard to the cellularity, only the ectopic model showed a significant increase between early (mean, $4755 \text{ mm}^{-2} \pm 127$) and advanced stages (mean, $5917 \text{ mm}^{-2} \pm 398$; $P = .03$). For the orthotopic model, cellularity did not change significantly during tumor growth (mean, $6168 \text{ mm}^{-2} \pm 855$ vs $6274 \text{ mm}^{-2} \pm 398$; $P = .9$) (Fig 4).

Correlations during Tumor Growth

Three significant correlations were observed. First, the increase of $|G^*|$ was correlated to the increase of MVD in the orthotopic model ($r = 0.78$, $P = .002$), whereas the correlation was not significant for the ectopic model ($r = 0.70$, $P = .08$). Second, the increase of $|G^*|$ was closely correlated to an increase in cellularity ($r = 0.96$, $P = .02$) for the ectopic model. Third, there was a negative correlation ($r = 0.77$, $P = .04$) between the decrease of ADC and increase of cellularity for the ectopic model.

MR Imaging after CA4P Treatment

After CA4P treatment, a significant decrease in mean $|G^*|$ was measured for the ectopic model (from $6.6 \text{ kPa} \pm 0.8$ to $4.8 \text{ kPa} \pm 0.7$, $P < .0001$). Mean $|G^*|$ of the orthotopic model did not change and remained at $6.1 \text{ kPa} \pm 1.2$ ($P = .7$). Mean ADC increased significantly in the ectopic model ($[0.52 \pm 0.05] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ vs $[0.68 \pm 0.13] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$; $P = .047$) and in the orthotopic model ($[0.61 \pm 0.02] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ vs $[0.78 \pm 0.12] \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$; $P = .01$) (Fig 5).

Histologic Analysis after CA4P Treatment

In this part, macroscopic necrosis at the anatomic level (identified with visual inspection) was distinguished from microscopic necrosis at the cellular level (identified with microscopy). The comparison of the T2-weighted anatomic images and hematoxylin-eosin-stained slices between control and treated mice at day 11 revealed an increase of macroscopic necrosis at the center of the tumors (mean, $7\% \pm 2$ vs $43\% \pm 3$ and $14\% \pm 8$ vs $25\% \pm 8$ for the ectopic and orthotopic models, respectively). The necrosis present in the data was of hemorrhagic origin, hence leading to hypointense signal in the corresponding T2-weighted images (31). CA4P treatment

significantly decreased the fluorescence signal originating from the perfused cell nuclei near viable vessel nuclei by a mean of $50\% \pm 8$ (ectopic model) and of $56\% \pm 8$ (orthotopic model) ($P < .0001$) compared with control mice at day 11. Thus, the fraction of perfused vessels was significantly affected by therapy in the two models.

A significant decrease in the mean MVD ($208 \text{ mm}^{-2} \pm 66$; $P = .03$) in the viable area was measured for the ectopic model (Fig 5). However, the mean MVD in case of the orthotopic model was not affected by the therapy ($372 \text{ mm}^{-2} \pm 34$; $P = .6$). The cellularity significantly increased (mean, $7322 \text{ mm}^{-2} \pm 645$; $P = .003$) in the ectopic model, with a fraction of proliferative cells (mean, 0.57 ± 0.03). For the orthotopic model, cellularity was not modified (mean, $6497 \text{ mm}^{-2} \pm 556$; $P = .47$). Hematoxylin-eosin analysis showed microscopic necrotic areas (approximately 10% of surface area) appearing even in the viable peripheral zone in the two tumor models (Fig E2 [online]).

Discussion

We observed in two experimental models of colon cancer that DW MR imaging and MR elastography are complementary tools

Figure 4

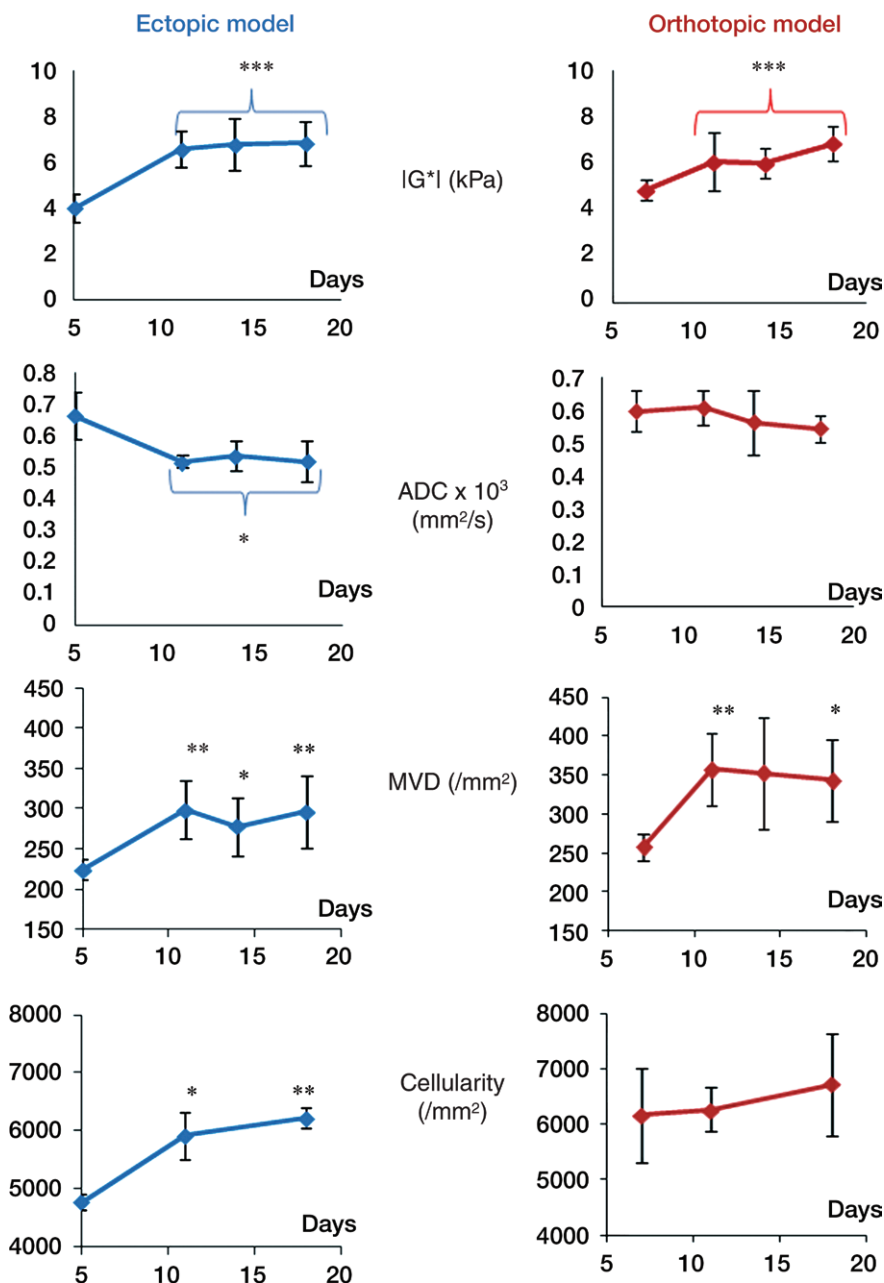


Figure 4: Graphs show evolution of $|G^*|$, ADC, MVD, and cellularity during CT26 tumor growth in mice. The measurements of $|G^*|$ showed a significant increase in the mechanical properties when the tumor switched from its early stage to its angiogenic stage. ADC decreased significantly for the ectopic model between early and angiogenic stages, whereas no significant ADC changes were observed in the orthotopic model. MVD increased between the early stage at day 5 and the intermediate stage at day 11 in the two tumor models. In regard to cellularity, only the ectopic model showed a significant increase between early and advanced stages. * = $P < .05$, ** = $P < .01$, *** = $P < .001$.

for assessing changes in tumor cellularity and tumor vascularity both during tumor growth and after antivascular treatment.

During tumor growth, we could confirm that changes in ADC reflect changes in cellularity, namely increased

cellular density leads to a decrease of ADC. Moreover, constant cellularity does not change the ADC (32), making DW MR imaging an attractive method for assessing cellularity and characterizing cellular integrity (6). In the orthotopic model, we also observed that ADC is not sensitive to MVD alterations.

In regard to the mechanical properties of tissue, during tumor growth, we saw increased $|G^*|$ that tended to correlate with increased MVD; while the same trend could be observed for both tumor models, a significant correlation was only observed between MVD and $|G^*|$ in the case of the orthotopic model. This correlation is weakened for the ectopic model, probably due to the observed changes in the cellularity. Apparently, in this case, MVD and cellularity contributed to the evolution of the mechanical properties. An increase in cell density was even correlated, for the subcutaneous implantation, with an increase in the mechanical properties. However, the switch between early and angiogenic stages for both models could be followed by MR elastography, while this was not the case for the ADC measurements.

After CA4P administration, for both models, we observed an increase in ADC compared with baseline values, despite the fact that the two models did not evolve similarly. While cellularity significantly increased in the ectopic model, it was not modified in the orthotopic model. The apparent discrepancy of an increase in ADC in conjunction with an increase in cell density is probably related to the presence of micronecrosis (33). We assume that the increase in cellularity in the ectopic model—normally leading to a decrease in ADC—was outperformed by the presence of necrotic microfoci, which tended to increase the ADC.

After CA4P treatment, $|G^*|$ correlated to MVD. We observed a very different behavior between the two tumor models. While both $|G^*|$ and MVD decreased significantly in the ectopic model, they remained unchanged after treatment in the orthotopic model. Hence, in case of the orthotopic model, the $|G^*|$ was neither sensitive to alterations of the perfused vessels nor to the

Figure 5

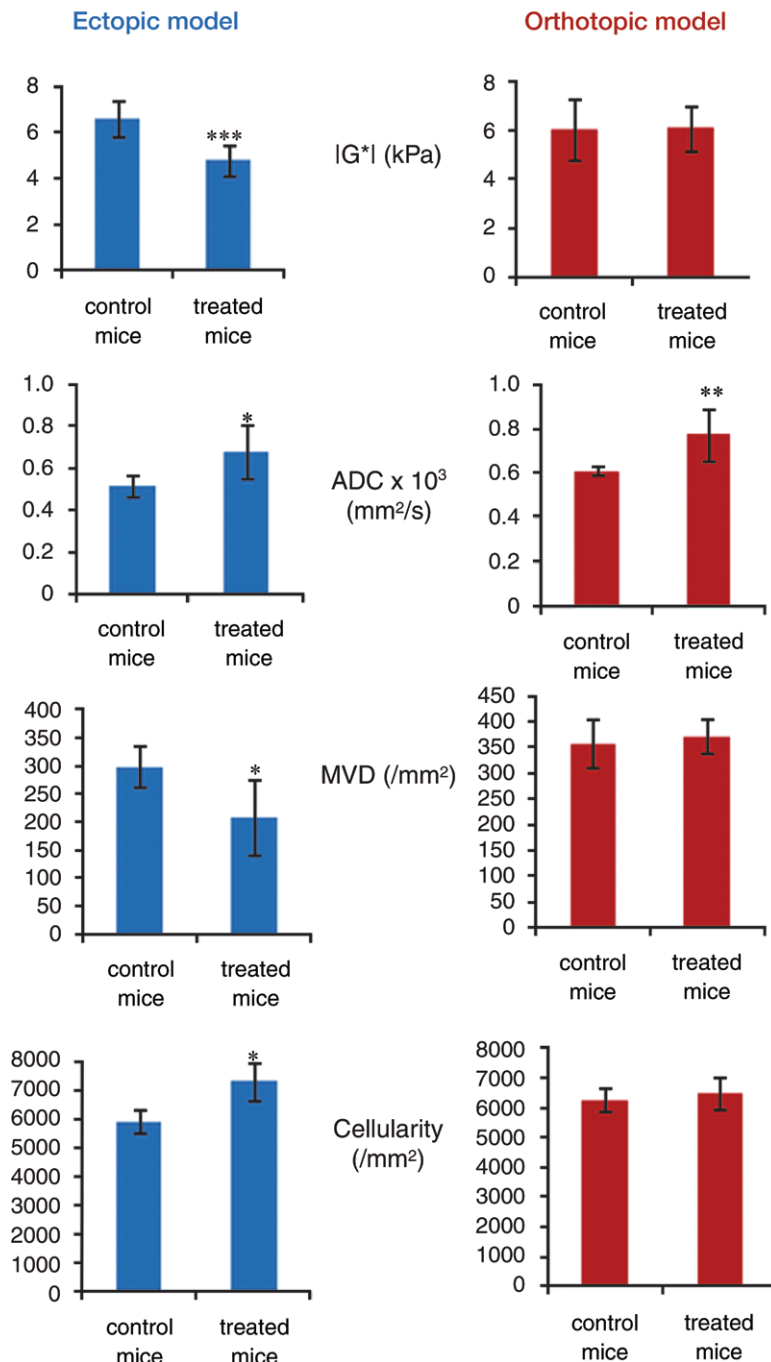


Figure 5: Graphs show evolution of $|G^*|$, ADC, MVD, and cellularity 24 hours after injection of CA4P. After treatment, a significant decrease in $|G^*|$ was measured in the ectopic model. In parallel, $|G^*|$ of the orthotopic model did not change. ADC increased significantly in the ectopic model and more strongly in the orthotopic model. A significant decrease in the MVD was measured for the ectopic model. However, the MVD of the orthotopic model did not change significantly after therapy. The cellularity increased significantly in the ectopic model, but not in the orthotopic model. * = $P < .05$, ** = $P < .01$, *** = $P < .001$.

appearance of necrotic microfoci (as determined by using histologic analysis). Moreover, Hoechst staining showed that the CA4P treatment was effective for both models because the amount of perfused vasculature decreased. In contrast, CD31 staining showed architectural modifications only in the ectopic model. This staining revealed the presence of endothelial cells of blood vessel in general, independent of their function (ie, whether they are perfused). Those changes correlated to significant changes in $|G^*|$ for the ectopic model. This factor suggests that the shear modulus is influenced by the architecture (presence or absence) of the blood vessels and not by their state of perfusion.

These results show that MR elastography may be used to follow up tumor evolution and effectiveness of antivascular agents. Actually, MR elastography may perform even better than DW MR imaging in this regard. Indeed, when MVD decreased, the only responding indicator was the $|G^*|$. Although several alterations of the structure (vasculature, cellularity, and extracellular components) could induce alterations of the tumor mechanical properties, there was a clear relationship between the vascularity and the mechanical properties (33,34). Mechanical properties are therefore potentially able to trace alterations of the vascularity induced by antivascular treatments.

This study had some limitations. First, not all possible causes for changes of the mechanical properties were assessed. Increase of MVD and cellularity were considered as the most probable causes of shear modulus changes. Hematoxylin-eosin analysis showed that the percentage of extracellular matrix in both models was low (less than 10%); henceforth, its effect was thus not studied. Second, in this study, the mean ADC and $|G^*|$ were assessed only for the viable area. The assessment of diffusivity and mechanical parameters in the other zones of the tumor might provide additional information. Finally, only MVD was assessed as structural parameter of the microvessels. Further studies about the effect of the vascular volume fraction, typical vessel sizes, vascular topology, and fluctuation in local blood volume and

blood flow on the shear wave propagation will have to be performed.

Practical application: The results of this study show that mechanical properties and diffusivity provide noninvasive complementary information during tumor growth and regression that are respectively linked to vascularity and the balance between tumor micronecrosis and cellularity. If these results are confirmed in humans, viscoelastic properties could become a pertinent biomarker of vasculature in tumor growth and regression after antivascular treatment. Therefore, elastography could find new applications in the follow-up of effectiveness of antivascular treatment.

Acknowledgments: We thank Nathalie Colnot, BSc, Sylvie Mosnier, BSc, and Brigitte Boulougé, BSc, Department of Pathology, Beaujon Hospital (Clichy, France), for their advice, help, and availability. We also thank Laura Simon, BSc, UPGI, UMR8151, U1022, Department of Chemical Pharmacology, Genetics, and Imaging, Université Paris Descartes, (Paris, France).

Disclosures of Potential Conflicts of Interest: **L.J.** No potential conflicts of interest to disclose. **B.T.D.** No potential conflicts of interest to disclose. **J.S.** No potential conflicts of interest to disclose. **M.A.** No potential conflicts of interest to disclose. **B.L.** No potential conflicts of interest to disclose. **N.M.** No potential conflicts of interest to disclose. **G.G.C.** No potential conflicts of interest to disclose. **D.S.** No potential conflicts of interest to disclose. **V.P.** No potential conflicts of interest to disclose. **V.V.** No potential conflicts of interest to disclose. **B.E.V.B.** No potential conflicts of interest to disclose. **R.S.** No potential conflicts of interest to disclose.

References

- Degani H, Chetrit-Dadiani M, Bogin L, Furman-Haran E. Magnetic resonance imaging of tumor vasculature. *Thromb Haemost* 2003;89(1):25–33.
- Chenevert TL, Meyer CR, Moffat BA, et al. Diffusion MRI: a new strategy for assessment of cancer therapeutic efficacy. *Mol Imaging* 2002;1(4):336–343.
- Rudin M. Imaging readouts as biomarkers or surrogate parameters for the assessment of therapeutic interventions. *Eur Radiol* 2007;17(10):2441–2457.
- Des Guez G, Uzzan B, Nicolas P, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer: meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006;94(12):1823–1832.
- Oliveira SC, Machado KK, Sabbaga J, Hoff PM. Integration of anti-vascular endothelial growth factor therapies with cytotoxic chemotherapy in the treatment of colorectal cancer. *Cancer J* 2010;16(3):220–225.
- Hamstra DA, Rehemtulla A, Ross BD. Diffusion magnetic resonance imaging: a biomarker for treatment response in oncology. *J Clin Oncol* 2007;25(26):4104–4109.
- Padhani AR, Miles KA. Multiparametric imaging of tumor response to therapy. *Radiology* 2010;256(2):348–364.
- Feron O. Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(10):536–542.
- Manduca A, Oliphant TE, Dresner MA, et al. Magnetic resonance elastography: non-invasive mapping of tissue elasticity. *Med Image Anal* 2001;5(4):237–254.
- Kruse SA, Smith JA, Lawrence AJ, et al. Tissue characterization using magnetic resonance elastography: preliminary results. *Phys Med Biol* 2000;45(6):1579–1590.
- Mariappan YK, Glaser KJ, Ehman RL. Magnetic resonance elastography: a review. *Clin Anat* 2010;23(5):497–511.
- Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998;1999;17(3):279–284.
- Griswold DP, Corbett TH. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 1975;36(6 suppl):2441–2444.
- Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005;22(1–2):16–25.
- Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 1999;17(4):343–359.
- Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975;35(9):2434–2439.
- Kerbel RS. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev* 1998–1999;17(3):301–304.
- Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005;5(6):423–435.
- El-Emir E, Boxer GM, Petrie IA, et al. Tumour parameters affected by combretastatin A-4 phosphate therapy in a human colorectal xenograft model in nude mice. *Eur J Cancer* 2005;41(5):799–806.
- Salmon BA, Salmon HW, Siemann DW. Monitoring the treatment efficacy of the vascular disrupting agent CA4P. *Eur J Cancer* 2007;43(10):1622–1629.
- Muthupillai R, Lomas DJ, Rossman PJ, Greenleaf JF, Manduca A, Ehman RL. Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science* 1995;269(5232):1854–1857.
- Salameh N, Larrat B, Abarca-Quinones J, et al. Early detection of steatohepatitis in fatty rat liver by using MR elastography. *Radiology* 2009;253(1):90–97.
- Sinkus R, Tanter M, Xydeas T, Catheline S, Bercoff J, Fink M. Viscoelastic shear properties of in vivo breast lesions measured by MR elastography. *Magn Reson Imaging* 2005;23(2):159–165.
- Sinkus R, Siegmund K, Xydeas T, Tanter M, Claussen C, Fink M. MR elastography of breast lesions: understanding the solid/liquid duality can improve the specificity of contrast-enhanced MR mammography. *Magn Reson Med* 2007;58(6):1135–1144.
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin ML, Vignaud J, Laval-Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology* 1988;168(2):497–505.
- Berry LR, Barck KH, Go MA, et al. Quantification of viable tumor microvascular characteristics by multispectral analysis. *Magn Reson Med* 2008;60(1):64–72.
- Schraml C, Schwenzer NF, Martirosian P, et al. Diffusion-weighted MRI of advanced hepatocellular carcinoma during sorafenib treatment: initial results. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193(4):W301–W307.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991;114(5):1059–1068.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710–1715.
- Smith KA, Hill SA, Begg AC, Denekamp J. Validation of the fluorescent dye Hoechst 33342 as a vascular space marker in tumours. *Br J Cancer* 1988;57(3):247–253.
- Choo SW, Kim SH, Jeong YG, Shin YM, Kim JS, Han MC. MR imaging of segmental renal infarction: an experimental study. *Clin Radiol* 1997;52(1):65–68.
- Patterson DM, Padhani AR, Collins DJ. Technology insight: water diffusion MRI—a potential new biomarker of response to cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5(4):220–233.
- Norris DG. The effects of microscopic tissue parameters on the diffusion weighted magnetic resonance imaging experiment. *NMR Biomed* 2001;14(2):77–93.
- Holm S, Sinkus R. A unifying fractional wave equation for compressional and shear waves. *J Acoust Soc Am* 2010;127(1):542–559.

Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice

Yasmine S. Touil · Johanne Seguin ·
Daniel Scherman · Guy G. Chabot

Received: 5 July 2010 / Accepted: 26 October 2010 / Published online: 11 November 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract

Purpose The natural flavonoid fisetin was recently identified as a lead compound that stabilizes endothelial cell microtubules. In this study, we investigated the antiproliferative and antiangiogenic properties of fisetin *in vitro* and *in vivo*.

Methods Fisetin cytotoxicity was evaluated using Lewis lung carcinoma cells (LLC), endothelial cells and NIH 3T3 cells. Endothelial cell (EC) migration and capillary-like structure formation were evaluated using EAhy 926 cells. *In vivo* tumour growth inhibition studies were performed using LLC-bearing mice treated with fisetin and/or cyclophosphamide (CPA).

Results The fisetin IC₅₀ was 59 μ M for LLC and 77 μ M for EC cells, compared to 210 μ M for normal NIH 3T3 cells (24 h). Fisetin inhibited EC migration and capillary-like structure formation at non-cytotoxic concentrations (22–44 μ M). In mice, fisetin inhibited angiogenesis assessed using the Matrigel plug assay. In LLC-bearing mice, fisetin produced a 67% tumour growth inhibition (223 mg/kg, intraperitoneal), similar to the 66% produced by low-dose CPA (30 mg/kg, subcutaneous). When fisetin and CPA were combined, however, a marked improvement in antitumour activity was observed (92% tumour growth inhibition), with low systemic toxicity. Tumour histology showed decreased microvessel density with either fisetin or

CPA alone, and a dramatic decrease after the fisetin/CPA combination.

Conclusions We have shown that fisetin not only displays *in vitro* and *in vivo* antiangiogenic properties, but also can markedly improve the *in vivo* antitumour effect of CPA. We propose that this drug combination associating a non-toxic dietary flavonoid with a cytotoxic agent could advantageously be used in the treatment of solid tumours.

Keywords Flavonoid · Fisetin · Cyclophosphamide · Lewis lung carcinoma · EA-hy 926 endothelial cells · Angiogenesis · Cytotoxicity · Antitumour activity

Background

Tumour vasculature is an attractive target for cancer therapy because a single vessel provides oxygen and nutrients to numerous tumour cells and is the main route for metastatic dissemination of cancer cells (reviewed in [1]). Tumour angiogenesis is the result of an imbalance between pro-angiogenic factors, e.g., vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and endogenous antiangiogenic factors, such as angiostatin and endostatin [2–4]. Tumour vasculature can be targeted at the angiogenesis level to prevent the formation of new vessels using antiangiogenic agents, or at the vascular level using vascular disrupting agents on already formed vessels [5, 6]. The antiangiogenesis approach has already proven its clinical effectiveness in colon, breast, and non-small-cell lung cancer using VEGF antibody in combination with cytotoxic drugs [7–9].

Several phytochemicals, or compounds derived from edible plants, have been linked to the chemoprevention of

Y. S. Touil · J. Seguin · D. Scherman · G. G. Chabot (✉)
Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University,
Chimie ParisTech, Chemical,
Genetic and Imaging Pharmacology Laboratory
(INSERM U1022, CNRS UMR 8151),
4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France
e-mail: guy.chabot@parisdescartes.fr

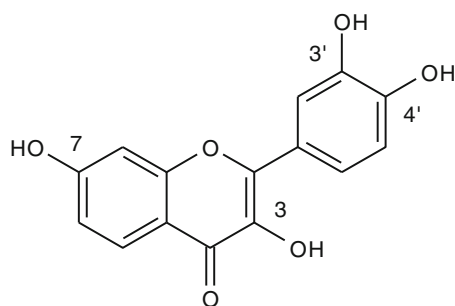


Fig. 1 Chemical structure of fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone)

cancer [10]. Among these compounds, the natural flavonoids have been shown to display pharmacological properties of interest in the prevention and treatment of cancer, as cytotoxic and/or as antiangiogenic agents [11–14].

In a programme aimed at finding novel antiangiogenic agents, we recently identified the natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) as an interesting lead that can stabilize endothelial cells *in vitro* at non-cytotoxic concentrations (Fig. 1) [15]. Fisetin is present in several fruits, vegetables, nuts and wine [16, 17] and displays a variety of biological effects including antioxidant, anti-inflammatory [18, 19], anticarcinogenic and *in vitro* antiangiogenesis [20]. Fisetin has already been shown to be cytotoxic to various human cancer cell lines including leukaemia (HL60) [21], breast (MCF7) [20], colon (HT29) [22], liver (SK-HEP-1, Caco-2) [22, 23], neuroblastoma (SHEP, WAC-2) [20], prostate (LNCaP, PC3) [24], and also to several endothelial cells [20]. Fisetin has been shown to inhibit several molecular targets, including cyclin-dependent kinases [25–27], DNA topoisomerases I and II [28, 29], urokinase [30], actin [31], and androgen receptor signalling [32]. It has also recently been found that fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint involving the inhibition of Aurora B activities required for the maintenance of normal spindle checkpoint signalling [33].

In the present study, we further tested fisetin's *in vitro* antiangiogenic action and evaluated its *in vivo* antitumour activity in Lewis lung carcinoma-bearing mice. We report here that fisetin displays antiangiogenic properties *in vitro* as well as *in vivo* inhibition of Lewis lung carcinoma tumour growth involving an antiangiogenic mechanism. In addition, when fisetin was combined with low-dose cyclophosphamide, a remarkable improvement in antitumour activity involving an antiangiogenic mechanism of action was observed. We propose that this relatively non-toxic drug combination using a dietary phytochemical with low-dose cyclophosphamide could advantageously be used in the treatment of solid tumours.

Methods

Chemicals

Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) and cyclophosphamide were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Fisetin stock solution was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at 4°C in the dark. Cyclophosphamide was dissolved in sterile water.

Cell viability

The murine Lewis lung carcinoma (LLC) cell line, the NIH 3T3 murine fibroblast cell line and the EAhy 926 endothelial cell line (an immortalized human umbilical vein endothelial cell line [34]) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (37°C, 5% CO₂). Exponentially growing cells were plated onto 96-well plates at 5,000 cells per well in 200 µl. After 24 h, cells were exposed to fisetin at the indicated concentrations for an additional 48 h. Viability was assessed using the MTT (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium) test, and absorbance was read at 562 nm using a microplate reader (BioKinetics Reader, EL340). Appropriate controls with DMEM only and MTT were used to determine background absorbance. Experiments were run in quadruplicate and repeated 3 times. Control cells were exposed to 1% DMSO which was not cytotoxic. The results are presented as the inhibitory concentration for 50% of cells (IC₅₀).

Cell cycle analysis

Lewis lung carcinoma and EAhy 926 endothelial cells were seeded in 6-well plates at 10⁵ cells/well. Twenty-four hours later, fisetin was added to the wells at the indicated concentrations, and the cells were incubated for 48 h. For each condition, detached and adherent cells were harvested, fixed for at least 30 min in 70% ethanol, and incubated with propidium iodide (50 µg/ml), sodium citrate (1 mg/ml) and RNase A (50 µg/ml) for 30 min in the dark. Nuclei DNA content was determined by flow cytometry (Coulter Epics Beckman, Germany) with red emission (FL-2 channel, 570 nm). After debris exclusion using forward/side scatter gating, 10⁴ nuclei were acquired and analysed using the WinMDI software. Cells with sub-G₁ DNA content were considered to be apoptotic.

Cell migration assay (scratch wound assay)

EAhy 926 endothelial cells were grown to confluence and a wound was introduced by clearing an area of the monolayer using a 100- μ l pipette tip. Digital photographs of wounded areas were recorded from each well at a magnification of 100 $\times$ (time 0 h). Following a change of medium, basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/ml, BD Biosciences) and fisetin at the indicated concentrations were added to the medium with 2.5% of FBS. After 24-h incubation, digital photographs of the wound areas were recorded for each well. Migration was evaluated by manually drawing the distance of the wound area (d) at T_{0h} and T_{24h} . Distance values were obtained using the ImageJ software [35]. Results were expressed as a percentage of the controls using the following formula: $100 \times [1 - (dT_{0h} - dT_{24h} \text{ of treated cells}) / (dT_{0h} - dT_{24h} \text{ of control cells})]$. Experiments were performed in triplicate for each concentration and were repeated 3 times.

Formation of capillary-like structures

Fifty microlitres of gel matrix solution was applied to each well of a 96-well plate and incubated for 30 min at 37°C. EAhy 926 cells (1×10^4) were suspended in 100 μ l of medium, plated onto the gel matrix and incubated at 37°C. Adherent cells received bFGF (10 ng/ml) and fisetin at the indicated concentrations. After a 24-h exposure, in vitro angiogenesis was assessed by counting the number of capillary-like structures in each well at 100 $\times$ magnification with a light microscope (Zeiss). The in vitro antiangiogenic effect was calculated using the following formula: $100 \times [1 - (\text{number of capillary-like tubes in treated cells}) / (\text{number of capillary-like tubes in control cells})]$. Experiments were performed in duplicate for each condition and repeated 3 times.

Animal experiments

All animal experiments were ethically conducted, according to institutional, French and European guidelines and were approved by the institutional animal welfare committee.

Matrigel plug angiogenesis assay

Fifteen 6-week-old C57BL/6 J female mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were randomly divided into five groups. LLC cells were trypsinized and resuspended at 3×10^7 cells/ml in serum-free medium. Aliquots of cells (0.1 ml, 3×10^6 cells) were mixed with 0.2 ml of phenol red-free Matrigel and injected into the right flank of mice.

For the fisetin-treated groups, the cells were injected with four increasing concentrations of fisetin: 12.5, 25, 50 and 100 μ g/ml (or 22, 44, 87, 175 and 350 μ M). Controls included cells with equal volumes of solvent, whereas the Matrigel mixed with the medium alone was used as a negative control. The Matrigel plugs were removed 14 days after the implantation, weighed and measured for haemoglobin content using the Drabkin's reagent kit according to the manufacturer's instructions (Sigma–Aldrich). Haemoglobin concentration was calculated based on a set of haemoglobin standards. The data are presented as mean $\pm$ SEM from triplicate experiments.

Evaluation of antitumour activity in mice

In preliminary experiments with non-tumoured C57BL/6J female mice, fisetin at 223 mg/kg intraperitoneally (i.p.) was found non-toxic (based on body weights) when administered for 5 consecutive days in week 1 and for 5 consecutive days in week 2. Fisetin was dissolved in polyethylene glycol 200 (PEG₂₀₀)/DMSO (7:3; v:v) and injected i.p. in a volume of 0.1 ml. For antitumour evaluation, Lewis lung tumour fragments (about 3 mm³) were injected subcutaneously (s.c.) bilaterally into mouse flanks. Tumour growth was assessed every 2 days using bi-dimensional measurements with a caliper. Tumour volume (mm³) was calculated according to the formula: $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.5$ (mm). In the first experiment, fisetin was injected i.p. into 5 tumoured mice at 223 mg/kg on days 5 to 9 and days 12 to 16 post-tumour implantation. In a second experiment, 20 mice were randomly divided into 4 groups. Fragments of LLC tumour (3 mm³) were injected bilaterally s.c. into the mouse flanks, and 4 days after tumour implantation, the mice were submitted to the following treatments: mice in the fisetin group were injected i.p. on days 4 to 8, 11, 12, and 14 with 223 mg/kg of fisetin dissolved in a 0.1-ml volume of PEG₂₀₀/DMSO (7:3; v:v); mice in the cyclophosphamide group were injected s.c. on days 4, 5, 7 and 8 with 30 mg/kg of cyclophosphamide dissolved in water; mice in the combination group were treated with both fisetin and cyclophosphamide as described above; mice in the control group were injected with both vehicles. The 30 mg/kg dose cyclophosphamide was based on previous work that showed that doses of 10–40 mg/kg can be administered daily for prolonged period without undue toxicity [36]. For comparison purposes, the maximum tolerated dose of cyclophosphamide in mice is between 186 and 220 mg/kg when administered as a single dose [37, 38] and 170 mg/kg when given every 6 days [39]. Therefore, the 30 mg/kg dose for 4 days used in our experiments can be considered a low cyclophosphamide dose that was not toxic, based on body weight data. Tumour measurements were recorded

three times weekly; the mice were euthanized 15 days after tumour inoculation.

Microvessel density evaluation

Tumour tissues were harvested, weighed, frozen in isopentane, immersed in liquid nitrogen, and stored at -70°C until preparation of the histology slides. Ten-micron frozen tissue sections were placed on Superfrost Plus slides. Immunostaining of PECAM-1 (monoclonal rat antibodies anti-PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), clone MEC13.3; BDPharmingen, Le Pont-De-Claix, France) was performed using a three-step procedure as previously described [40]. In brief, the sections were washed three times in $1\times$ phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 10 min in 0.3% hydrogen peroxide/PBS. The slides were washed three times with $1\times$ PBS and incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) at room temperature for 30 min. The sections were incubated with the rat primary antibodies anti-PECAM-1 (1:50) in a humidified chamber at 37°C for 1 h. After three washes in PBS, the slides were incubated for 30 min with biotinylated-secondary antibody with goat anti-rat IgG (1:400). After 3 rinses, slides were again incubated with the streptavidin-conjugated peroxidase according to the manufacturer's instructions (dilution 1/400). The 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate was then added for 5–7 min until a brown precipitate was visible. Sections were rinsed several times in $1\times$ PBS. Sections incubated with BSA instead of the primary antibodies were used as negative controls. Slides were counterstained with Gill's haematoxylin and treated with a 25% ammonia solution to generate a blue nuclear stain, dehydrated in graded ethanol solutions and xylene, and mounted with Eukit®. Microvessel density was evaluated under the microscope by counting 3 fields at a magnification of $100\times$ on two different slides. Microvessel density was expressed as the number of PECAM-1-positive microvessels per mm^2 .

Statistical analyses

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. Comparisons between means were assessed using the Student *t* test for unpaired data. If unequal variance was observed, Welch's correction was applied. Comparisons between several groups were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's multiple comparison test, using an appropriate control group as the reference. The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

Fisetin effects on cell viability, cell cycle and apoptosis of Lewis lung carcinoma (LLC) cells, endothelial cells (EAhy 926) and normal cells (NIH 3T3)

Fisetin induced a dose-dependent decreased viability in both Lewis lung carcinoma (LLC) and endothelial cells (EAhy 926), with IC_{50} s of 59 and 77 μM , respectively, for a 24-h exposure time (Table 1). Interestingly, normal NIH 3T3 cells were found 3 times less sensitive to fisetin than either LLC or endothelial cells, with an IC_{50} of 210 μM (Table 1). When the incubation time was increased to 48 h, the differential sensitivity between normal NIH 3T3 cells and LLC or EAhy 926 cells reached a fivefold difference.

To characterize the mechanism of the cytotoxic/anti-proliferative effect of fisetin, apoptosis was analysed on LLC and endothelial cells. Table 2 shows the DNA cell cycle and sub G_1 distribution of fisetin-treated cells after 48 h exposure at the indicated concentrations. Fisetin induced apoptosis in a dose-dependent manner in LLC cells, as measured by cells with sub- G_1 DNA content. At low concentrations (22 and 44 μM), fisetin induced apoptosis in 5% of LLC compared to 1% in control cells. Higher fisetin concentrations (175–350 μM) induced higher levels of apoptosis (29%). Fisetin also induced a dose-dependent decrease in cells in G_1 . All tested concentrations of fisetin induced an accumulation of cells in the G_2/M phase (25–36%) compared to controls.

The fisetin effects on the cell cycle distribution of EAhy 926 endothelial cells differed markedly from the LLC cell line. Indeed, at low concentrations (22 and 44 μM), fisetin already induced a higher percentage of apoptotic cells (11–15%), and at high fisetin concentrations (175 and 350 μM) high levels of apoptosis were achieved (38% and 60%, respectively). As sub- G_1 apoptosis increased, the per cent of cells in G_1 , S and in G_2/M phases decreased

Table 1 Inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) of Lewis lung carcinoma cells (LLC), EAhy 926 endothelial cells and normal NIH 3T3 cells

Incubation time (h)	Inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) of cells (μM)		
	LLC	EAhy 926	Normal NIH 3T3
24	$59 \pm 9^*$	$77 \pm 9^*$	210 ± 14
48	$27 \pm 0.3^*$	$28 \pm 0.3^*$	136 ± 13

Cells were exposed to fisetin at various concentrations for 24 or 48 h, and viability was evaluated by the MTT test. Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments each performed in quadruplicate. Statistical significance assessed by one-way analysis of variance followed by the Dunnett's multiple comparison test, using the IC_{50} of NIH 3T3 cells as the reference. * *P* <0.001

Table 2 Cell cycle analysis of Lewis lung carcinoma and EAhy 926 endothelial cells treated with fisetin

	Cell line	Fisetin Conc (μM)	Per cent cell in the indicated phase			
			SubG ₁	G1	S	G ₂ /M
Cells were exposed to the indicated concentrations of fisetin for 48 h. Cells were harvested, fixed, incubated with propidium iodide and analysed by flow cytometry. Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments	Lewis Lung Carcinoma cells	0	1 $\pm$ 1	70 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0.4	15 $\pm$ 1
		22	5 $\pm$ 1	51 $\pm$ 1	19 $\pm$ 0.3	25 $\pm$ 1
		44	5 $\pm$ 0.1	39 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1
		87	12 $\pm$ 0.1	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1
		175	29 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	31 $\pm$ 0.3	27 $\pm$ 2
		350	29 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	29 $\pm$ 0.1	28 $\pm$ 0.3
	EAhy 926 endothelial cells	0	4 $\pm$ 1	66 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2
		22	11 $\pm$ 2	67 $\pm$ 0.6	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
		44	15 $\pm$ 1	65 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	8 $\pm$ 0.3
		87	35 $\pm$ 2	52 $\pm$ 0.4	9 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
		175	38 $\pm$ 1	49 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2
		350	60 $\pm$ 0.3	31 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1

(Table 2). Contrary to LLC cells, no accumulation of fisetin-treated endothelial cells was observed in the G₂/M phase.

Fisetin inhibits angiogenesis in vitro

Effect of fisetin on migration of EAhy 926 endothelial cells

We next examined the possible antiangiogenic effects of fisetin on endothelial cell migration by using the scrape wound assay. Figure 2 illustrates that at 24-h post-wounding of confluent EAhy 926 endothelial cells, control cells migrated and totally filled the scraped area. Fisetin exposure at 22 and 44 μM (24 h), however, resulted in a significant dose-dependent decrease in EAhy 926 endothelial cell migration. The calculated IC₅₀ for the antimigration effect was 45 $\pm$ 0.3 μM (mean $\pm$ SEM from 3 independent experiments).

Effect of fisetin on capillary-like structure formation on Matrigel

The endothelial cell tube formation assay was used to investigate fisetin antiangiogenesis effect in vitro. EAhy 926 endothelial cells plated on Matrigel with bFGF formed a capillary-like network within 24 h, as expected (Fig. 3). Fisetin at 22, 44 and 87 μM prevented the formation of the capillary-like network in a dose-dependent fashion. The calculated IC₅₀ for the inhibition of capillary-like structure formation was 52 $\pm$ 7 μM (mean $\pm$ SEM from 3 independent experiments).

Fisetin inhibits angiogenesis in vivo

We then investigated fisetin tumour angiogenesis in vivo. LLC cells were mixed with Matrigel with increasing

concentrations of fisetin (44–350 μM) and injected s.c. into the right flank of mice. Fourteen days later, the mice were killed and the Matrigel plugs removed, weighed and evaluated for haemoglobin content. The Matrigel plugs were significantly smaller in the fisetin-treated groups compared to the controls. Matrigel plug weights decreased significantly as fisetin concentrations increased (Fig. 4a). To quantify angiogenesis, the haemoglobin content of the Matrigel plugs was assayed. As shown in Fig. 4b, fisetin treatment led to a dose-dependent decrease in Matrigel plug haemoglobin levels, which became significant at 350 μM . These in vivo results indicate that fisetin can decrease tumour angiogenesis.

Fisetin antitumour activity in vivo

To determine whether fisetin could inhibit tumour growth in vivo, fisetin was administered to two groups of 5 LLC tumour-bearing mice. Mice in the treated group were injected i.p. with fisetin at 223 mg/kg for 5 consecutive days during week 1, and for another 5 consecutive days in week 2. Mice in the control group received solvent on the same days as the fisetin-treated group. Preliminary experiments showed that fisetin alone was not toxic at this dose level and schedule of administration. On day 15, tumours from the mice treated with fisetin were 50% smaller than control tumours and appeared less vascularized than the controls (data not shown).

In vivo antitumour activity of the combination of fisetin and cyclophosphamide

To optimize the in vivo anticancer effect of fisetin found above, fisetin was next combined with low-dose cyclophosphamide, a cytotoxic drug reported to possess antian- giogenic properties [39]. Fisetin was administered i.p. at

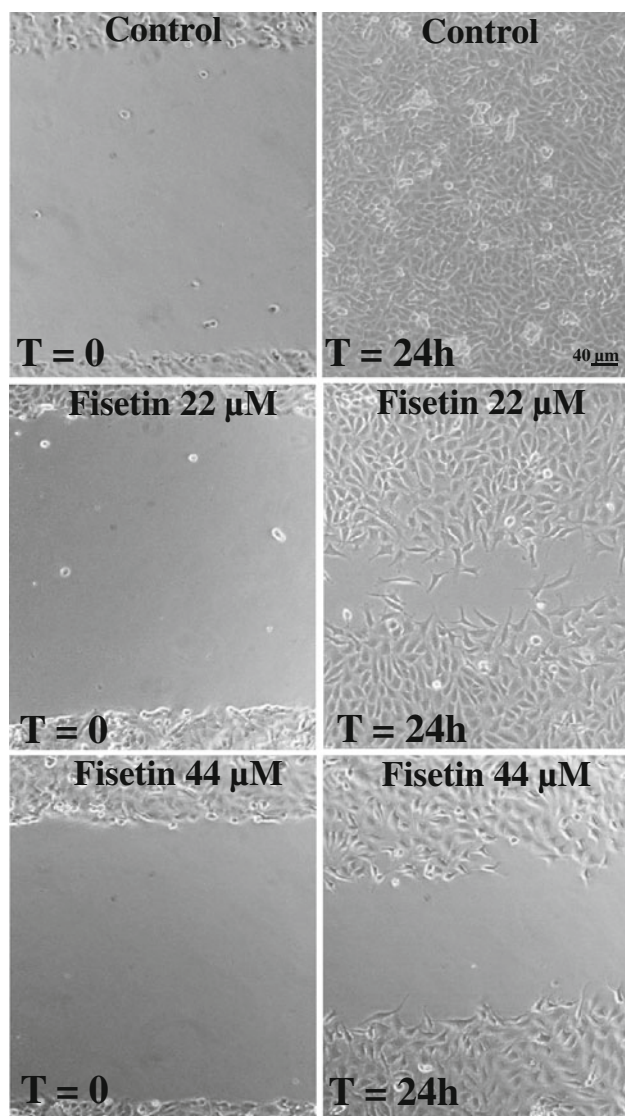


Fig. 2 Effect of fisetin on cell migration (scratch wound assay). EAhy 926 endothelial cells were grown to confluence, and an area was cleared using a 100- μ l pipette tip as described in the “Methods”. Digital photographs were recorded at a magnification of 100 $\times$ immediately after the wounding (Time = 0) and at 24 h ($T = 24$ h) after the addition of bFGF (10 ng/ml) for the control, or with bFGF plus the indicated concentration of fisetin. Scale bar, 40 μ m

223 mg/kg daily for 5 days in week 1 (days 4 to 8 post-tumour implantation), followed by three injections on days 11, 12 and 14 (Fig. 5, triangles). Fisetin treatment led to a 67% tumour growth inhibition compared to the controls (squares). Low-dose cyclophosphamide was administered s.c. at 30 mg/kg on four days in week 1 only (days 4, 5, 7, 8) and led to a tumour growth inhibition of 66%, similar to fisetin treatment (Fig. 5, diamonds). When fisetin and cyclophosphamide were combined at the same dose levels and schedules as used above, tumour volumes declined dramatically, showing 92% inhibition compared to controls on day 15 (Fig. 5, solid circles). Over the two-week

treatment, this drug combination was not toxic, showing only a 4.6% loss in body weight, similar to that of the fisetin treatment alone (4.3%).

In vivo fisetin antiangiogenic effect

To verify whether the in vivo tumour growth inhibition was due to an antiangiogenic effect, tumour sections were stained using PECAM-1 antibodies. PECAM-1 was mainly expressed in endothelial cell membranes of microvessels, as expected (Fig. 6a, control). The number of microvessels expressing PECAM-1 in the fisetin- and in the cyclophosphamide-treated tumours was significantly diminished compared to those in the control (Fig. 6a, b). However, the treatment with the fisetin and cyclophosphamide drug combination led to an impressive and significant decrease in microvessel density, as depicted in Fig. 6a and b.

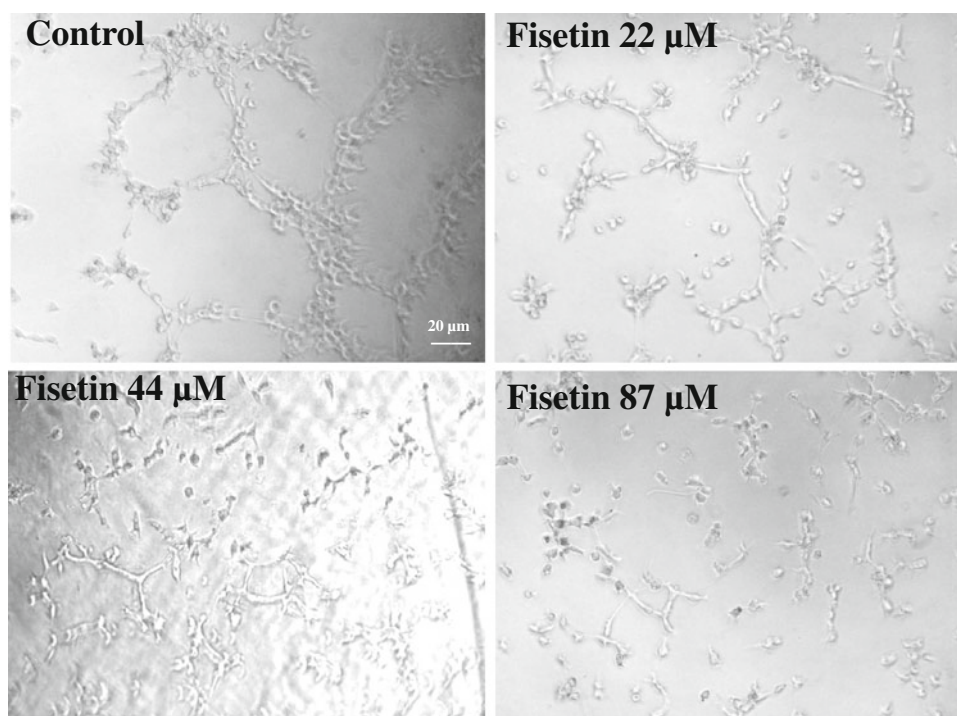
Discussion

Although several phytochemicals have been shown to possess pharmacological properties of potential interest in cancer prevention and/or therapy, their activity in the tumour angiogenic process is presently not well understood [10–14, 20]. Because we recently identified the dietary flavonoid fisetin as an interesting lead that can stabilize the cytoskeleton of endothelial cells in vitro at non-cytotoxic concentrations [15], we were therefore interested to evaluate the in vivo antiangiogenic activity of this compound.

The fisetin antiproliferative/cytotoxic activity determined in this study on LLC and endothelial cells confirmed its cytotoxic activity reported on other cancer cell lines, e.g., in prostate [24], liver [23], colon [25], and leukaemia cells [21]. In this study, normal NIH 3T3 cells were also found to be about threefold less sensitive to fisetin than LLC or endothelial cells. It is of interest that the fisetin relative selectivity towards cancer and endothelial cells, compared to normal cells, has also been observed in other studies [20], and this selectivity was also observed on prostate cancer cells that were shown to be more vulnerable to fisetin compared to normal prostate cells [24]. This relatively non-frequent cancer cell selectivity could therefore confer a valuable advantage of this compound for in vivo treatment.

We also observed that fisetin could block LLC cells in the G_2/M phase at low concentrations and could induce apoptosis in endothelial cells also at low concentrations. These observations would suggest that fisetin could first act in vivo on endothelial cells forming the tumour vasculature and then cause apoptosis of cancer cells in the vicinity of the blood vessel. Fisetin-induced G_2/M cell accumulation has been previously reported along with decreased activity

Fig. 3 Effect of fisetin on capillary-like structure formation. EAhy 926 endothelial cells were grown on Matrigel with bFGF (10 ng/ml) in the absence (control) or presence of the indicated fisetin concentrations for a 24-h incubation period. Digital photographs recorded at a magnification of 100 $\times$. Scale bar, 20 μ m



of several cyclin-dependent kinases [21, 23–25]. The signal transduction pathways involved in apoptosis include caspase 3 and increased p53 protein [23].

Our data clearly show that fisetin possesses *in vitro* antiangiogenic effects, preventing both the migration of endothelial cells and the formation of capillary-like structures at low micromolar concentrations. Previous work on *in vitro* antiangiogenic effects of fisetin has reported this effect at similar concentrations [20].

With regard to the relevance of the *in vitro* fisetin concentrations used in our experiments, the fisetin plasma concentrations achieved in mice are in the range of 10 μ M after intraperitoneal administration of a dose of 223 mg/kg (Touil YS and Chabot GG, unpublished data). In rats, free fisetin plasma concentrations of 50 μ M can also be achieved after an *i.v.* dose of 10 mg/kg [41]. These plasma concentrations are therefore in the range of the concentration used *in vitro* to show the antiangiogenic effects with the aglycone (free fisetin). In addition, it should be mentioned that because of the presence of 4 OH substituents on the fisetin molecule, glucuronide and sulphate conjugates are also present at high concentrations in plasma [41] (Touil YS and Chabot GG, unpublished data), and these metabolites could also play a role in the overall antiangiogenic effects observed *in vivo* in mice. It is of interest that flavonoid sulphates and/or glucuronides of closely related flavonoids (e.g., morin and quercetin) have recently been shown to display superior bioactivities compared to their aglycones (free forms) [42]. It should also be mentioned that mouse tumours usually have a high beta-

glucuronidase and sulfatase activities that could hydrolyse locally the conjugates to release the aglycone within the tumour, and therefore contribute to the local antitumour effect [43].

We next investigated whether these *in vitro* antiangiogenic effects could be translated *in vivo* using Lewis lung carcinoma-bearing mice. Fisetin was found to cause significant tumour growth inhibition when used as a single agent at non-toxic doses. The mechanism of action involved in the *in vivo* fisetin antitumour activity most likely involves an antiangiogenic effect, as evidenced by a significant reduction in microvessel density. Although fisetin's antiangiogenic activity has been previously reported *in vivo* in rabbit eyes, it should be mentioned that it was by direct application of an emulsion containing fisetin on the cornea [44] and not by systemic administration, as in the present study. To our knowledge, this report is the first describing the fisetin's *in vivo* antiangiogenic activities after systemic administration in mice.

In an attempt to improve fisetin's *in vivo* antitumour effects, we next combined this flavonoid with low-dose cyclophosphamide, because this cytotoxic agent has already been shown to improve antiangiogenic therapy [39, 45]. This drug combination clearly led to an impressive improvement in antitumour effect with a 92% tumour inhibition at non-toxic dosages of both agents. Although the fisetin-CPA drug combination is leading to a greater effect than either drug used alone, the magnitude of this effect could not be analysed using the Chou and Talalay's method because measurements made with single doses of

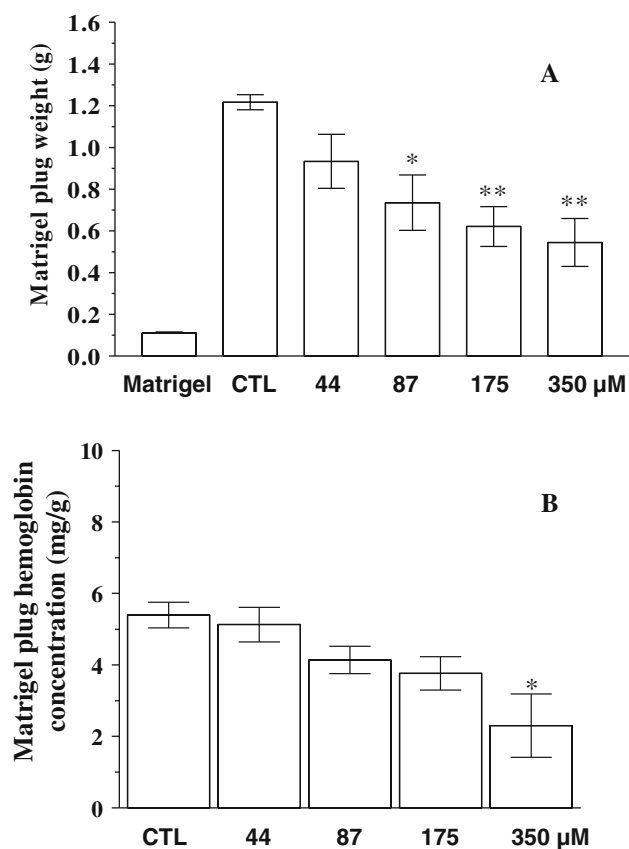


Fig. 4 In vivo Matrigel plug angiogenesis assay. Matrigel plugs containing Lewis lung carcinoma cells were implanted s.c. in mice with solvent (control = CTL) or with the indicated concentrations of fisetin. Fourteen days later, the Matrigel plugs were removed and weighed (**a**), and the content in haemoglobin was assessed (**b**), as described in the Methods. **P* value <0.05 and ***P* value <0.01 compared to controls (Dunnett's *t* test). The bar indicated "Matrigel" indicates the control without Lewis lung carcinoma cells

either drug in a combination can never alone determine synergism since the sigmoidicity of dose–effect curves and the exclusivity of drug effects cannot be determined from such measurements [46]. Because our data present only one dose level of either drug, we therefore cannot claim synergism, although there was a marked improvement in the anticancer activity of either drug at the single-dose level used, as evidenced by tumour growth curves. Moreover, the histological examination of the treated tumours clearly showed that the microvessel density was significantly reduced in the tumours of mice that received the drug combination, thus showing that an antiangiogenic effect was indeed involved in this impressive antitumour activity.

The precise molecular mechanism of action of the increased antitumour and antiangiogenic activity observed with the fisetin–cyclophosphamide drug combination is not precisely known for the moment. Although the antiangiogenic action of each compound alone is probably playing a major role in the improved activity of the combination,

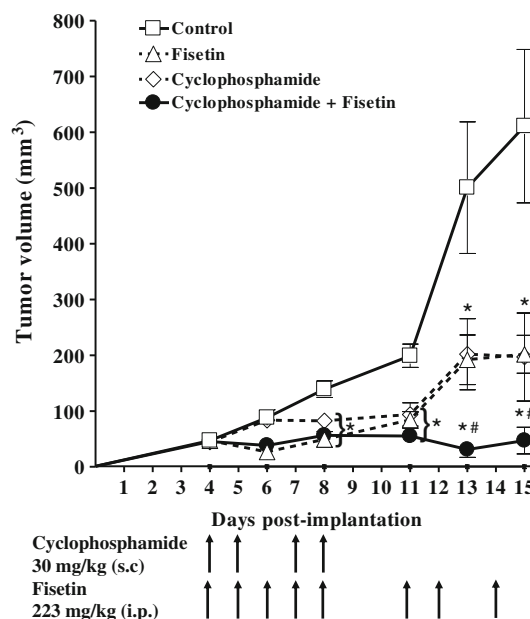
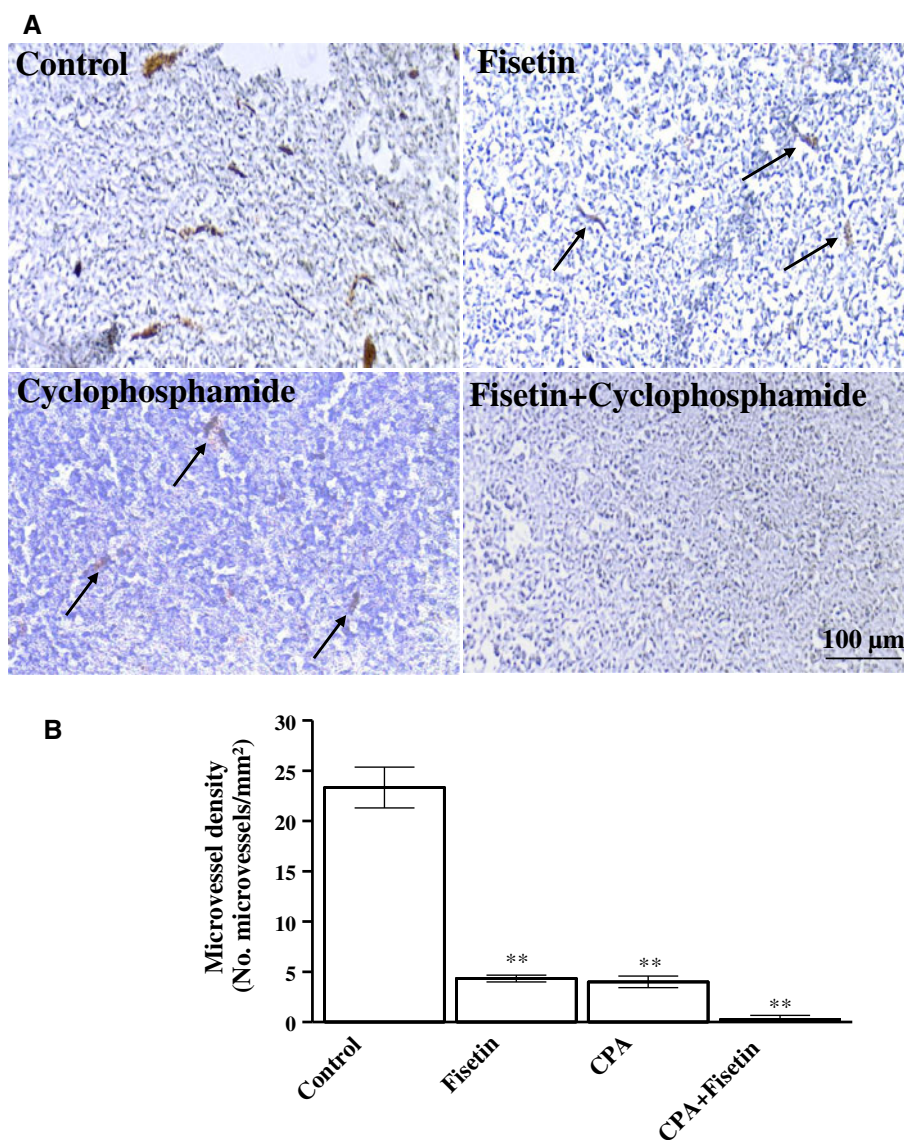


Fig. 5 In vivo antitumour activity of the combination of fisetin with cyclophosphamide. Twenty mice bearing bilateral Lewis lung tumours were randomly assigned to four groups of 5 mice as follows: control, solvent alone (*squares*); fisetin, 223 mg/kg i.p. on days 4 to 8 and days 11, 12, 14 (*triangles*); cyclophosphamide, 30 mg/kg s.c., on days 4, 5, 7, 8 (*diamonds*); and, the combination of cyclophosphamide and fisetin (*solid circles*), both administered at the same dose and schedule when used alone. Tumour volumes were determined as described in "Methods". Mean $\pm$ SEM. The * indicates a significant difference (*P* < 0.05) with the control group, and the # indicates a significant difference with the Fisetin or the cyclophosphamide group (ANOVA and Dunnett's multiple comparison test)

other factors could also be involved. For instance, a pharmacokinetic interaction would be possible, as was shown for the drug combination involving thalidomide and cyclophosphamide [37]. However, it should be mentioned that such a pharmacokinetic interaction was observed at a high dose of cyclophosphamide (220 mg/kg) [37], which is a sevenfold higher dose than the one used in the present study (30 mg/kg). Further studies will have to address this issue.

In addition to the stabilization of endothelial cells cytoskeleton [15], the antiangiogenic effect of fisetin and consequent antitumour activity could also involve the inhibition of urokinase plasminogen activator (uPA) in endothelial cells, as was recently reported [30]. UPA is over expressed in tumour vessels and is involved in extracellular matrix degradation responsible for endothelial cell migration and formation of new tumour blood vessels [47]. In addition to the Lewis lung carcinoma model, it is of interest to note that fisetin has recently been reported to be active in prostate cancer xenografts in nude mice through the inhibition of androgen receptor signalling, although angiogenesis was not investigated in this study [32]. Other

Fig. 6 Evaluation of microvessel density in Lewis lung carcinoma tumours. **a** Immunohistochemical evaluation of microvessels in Lewis lung tumours using antibodies to PECAM-1 as described in the Methods section. The tumours were treated in vivo with fisetin or cyclophosphamide alone, and with the combination of cyclophosphamide and fisetin. Scale bar, 100 μ m. **b** Microvessel density (number of vessels per mm^2) in tumours after in vivo treatment with the solvent alone (control), with fisetin or cyclophosphamide (CPA) alone, or with the combination of fisetin and cyclophosphamide (CPA). Mean $\pm$ SEM. The asterisks indicate a P value <0.05 compared to controls (Dunnett's multiple comparison test)



potential mechanisms of action could involve the direct or indirect inhibition of other factors involved in the complex tumour angiogenic process.

Conclusions

The data reported here provide the first evidence that the dietary flavonoid fisetin can display antiangiogenic and anticancer activities in vivo in mice bearing Lewis lung carcinoma. In addition, the remarkable improvement in the anticancer and antiangiogenic activities of the combination of fisetin with low-dose cyclophosphamide deserves further studies given the fact that cyclophosphamide is used in several anticancer drug regimens. Optimization of this drug combination by improved scheduling and/or

pharmaceutical formulations is therefore warranted. It is proposed that the relatively non-toxic drug combination studied in this work, associating a natural compound and a cytotoxic agent, could be useful in the treatment of solid tumours.

Acknowledgments This research was supported by the *Institut national de la santé et de la recherche médicale* (INSERM), by the *Centre national de la recherche scientifique* (CNRS), by the Institut Fédératif de Recherche (IFR-71) of the Université Paris Descartes, and by a grant from the *Institut National du Cancer* (National Cancer Institute of France, F-92513 Boulogne-Billancourt Cedex, France).

References

- Kerbel RS (2008) Molecular origins of cancer: tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358:2039–2049

2. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27–31
3. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249–257
4. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932–936
5. Taraboletti G, Margosio B (2001) Antiangiogenic and antivasculature therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol* 1:378–384
6. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 5:423–435
7. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335–2342
8. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF (2005) Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23:3697–3705
9. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS (2005) Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23:792–799
10. Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768–780
11. Lopez-Lazaro M (2002) Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2:691–714
12. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52:673–751
13. Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96:67–202
14. Hill S, Williams KB, Denekamp J (1989) Vascular collapse after flavone acetic acid: a possible mechanism of its anti-tumour action. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25:1419–1424
15. Touil YS, Fellous A, Scherman D, Chabot GG (2009) Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr Cancer* 61:310–321
16. Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N (2000) Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 130:2243–2250
17. Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S (1998) Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol* 8:168–175
18. Woodman OL, Chan EC (2004) Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:786–790
19. Park HH, Lee S, Oh JM, Lee MS, Yoon KH, Park BH, Kim JW, Song H, Kim SH (2007) Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacol Res* 55:31–37
20. Fotis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57:2916–2921
21. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca^{2+} -dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 63:225–236
22. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 38:133–142
23. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih CM, Yang LL (2002) Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol* 76:351–359
24. Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH (2006) Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 9:68–76
25. Lu X, Jung J, Cho HJ, Lim DY, Lee HS, Chun HS, Kwon DY, Park JH (2005) Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 135:2884–2890
26. Sung B, Pandey MK, Aggarwal BB (2007) Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkappaBalpha kinase activation. *Mol Pharmacol* 71:1703–1714
27. Lu H, Chang DJ, Baratte B, Meijer L, Schulze-Gahmen U (2005) Crystal structure of a human cyclin-dependent kinase 6 complex with a flavonol inhibitor, fisetin. *J Med Chem* 48:737–743
28. Olaharski AJ, Mondrala ST, Eastmond DA (2005) Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutat Res/Gene Toxicol Environ Mutagen* 582:79–86
29. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58:217–225
30. Jankun J, Selman SH, Aniola J, Skrzypczak-Jankun E (2006) Nutraceutical inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol Rep* 16:341–346
31. Böhl M, Tietze S, Sokoll A, Madathil S, Pfennig F, Apostolakis J, Fahmy K, Gutzeit HO (2007) Flavonoids affect actin functions in cytoplasm and nucleus. *Biophys J* 93:2767–2780
32. Khan N, Asim M, Afaq F, Abu ZM, Mukhtar H (2008) A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res* 68:8555–8563
33. Salmela AL, Pouwels J, Varis A, Kukkonen AM, Toivonen P, Halonen PK, Perala M, Kallioniemi O, Gorbosky GJ, Kallio MJ (2009) Dietary flavonoid fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint. *Carcinogenesis* 30:1032–1040
34. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3734–3737
35. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11:36–42
36. Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, Kerbel RS (2002) Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res* 62:2731–2735
37. Ding Q, Kestell P, Baguley BC, Palmer BD, Paxton JW, Muller G, Ching LM (2002) Potentiation of the antitumor effect of cyclophosphamide in mice by thalidomide. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:186–192
38. Siim BG, Lee AE, Shalal-Zwain S, Pruijn FB, McKeage MJ, Wilson WR (2003) Marked potentiation of the antitumor activity of chemotherapeutic drugs by the antivasculature agent 5, 6-dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA). *Cancer Chemother Pharmacol* 51:43–52

39. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J (2000) Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60:1878–1886
40. Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, Zurakowski D, Seachord C, Darveau RP, Mulliken JB, Corless CL, Bischoff J (1996) E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol* 148:1181–1191
41. Shia CS, Tsai SY, Kuo SC, Hou YC, Chao PD (2009) Metabolism and pharmacokinetics of 3, 3', 4', 7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone and anti-hemolysis effects of fisetin and its serum metabolites. *J Agric Food Chem* 57:83–89
42. Fang SH, Hou YC, Chang WC, Hsiu SL, Chao PD, Chiang BL (2003) Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. *Life Sci* 74:743–756
43. Massaad L, de Waziers I, Ribrag V, Janot F, Beaune PH, Morizet J, Gouyette A, Chabot GG (1992) Comparison of mouse and human colon tumors with regard to phase I and phase II drug-metabolizing enzyme systems. *Cancer Res* 52:6567–6575
44. Joussen AM, Rohrschneider K, Reichling J, Kirchhof B, Kruse FE (2000) Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp Eye Res* 71:483–487
45. Kakeji Y, Teicher BA (1997) Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs* 15:39–48
46. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55
47. Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1993) Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol* 122:673–684



Pharmaceutical nanotechnology

Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice

Héloïse Ragelle¹, Sylvie Crauste-Manciet¹, Johanne Seguin, Denis Brossard, Daniel Scherman, Philippe Arnaud, Guy G. Chabot*

Paris Descartes University, Faculty of Pharmacy, INSERM U1022, CNRS UMR8151, Chimie ParisTech, Sorbonne Paris Cité, Chemical, Genetic and Imaging Pharmacology Laboratory, F-75006 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Received in revised form 13 February 2012

Accepted 15 February 2012

Available online 24 February 2012

Keywords:

Nanoemulsion

Flavonoids

Fisetin

Pharmacokinetics

Bioavailability

Antitumour activity

ABSTRACT

The natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) has shown antitumour activity but its administration is complicated by its low water solubility. Our aim was to incorporate fisetin into a nanoemulsion to improve its pharmacokinetics and therapeutic efficacy. Solubility and emulsification tests allowed to develop an optimal nanoemulsion composed of Miglyol® 812N/Labrasol®/Tween® 80/Lipoid E80®/water (10%/10%/2.5%/1.2%/76.3%). The nanoemulsion had an oil droplet diameter of 153 ± 2 nm, a negative zeta potential (-28.4 ± 0.6 mV) and a polydispersity index of 0.129. The nanoemulsion was stable at 4 °C for 30 days, but phase separation occurred at 20 °C. Pharmacokinetic studies in mice revealed that the fisetin nanoemulsion injected intravenously (13 mg/kg) showed no significant difference in systemic exposure compared to free fisetin. However, when the fisetin nanoemulsion was administered intraperitoneally, a 24-fold increase in fisetin relative bioavailability was noted, compared to free fisetin. Additionally, the antitumour activity of the fisetin nanoemulsion in Lewis lung carcinoma bearing mice occurred at lower doses (36.6 mg/kg) compared to free fisetin (223 mg/kg). In conclusion, we have developed a stable nanoemulsion of fisetin and have shown that it could improve its relative bioavailability and antitumour activity.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the plant-derived compounds that have been linked to the chemoprevention and treatment of cancer, the flavonoids occupy a special place due to their abundance in human food and their relative non toxicity (Havsteen, 2002; Lopez-Lazaro, 2002; Middleton et al., 2000; Surh, 2003).

In a program aimed at finding new antiangiogenic agents in the flavonoid family, we have recently identified the natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) as an interesting lead that can stabilize endothelial cells in vitro at non cytotoxic concentrations (Touil et al., 2009). Fisetin is found in several fruits, vegetables, nuts and wine (Arai et al., 2000; Kimira et al., 1998) and displays a variety of biological effects including antioxidant,

anti-inflammatory (Park et al., 2007; Woodman and Chan, 2004), anti-carcinogenic and in vitro anti-angiogenesis (Fotsis et al., 1997). Fisetin has been shown to inhibit several molecular targets, including cyclin-dependent kinases (Lu et al., 2005a,b; Sung et al., 2007), DNA topoisomerases I and II (Constantinou et al., 1995; Olaharski et al., 2005), urokinase (Jankun et al., 2006), actin polymerization (Böhl et al., 2007), and androgen receptor signalling (Khan et al., 2008).

In vivo, fisetin has recently been shown to possess interesting anticancer activity in mice bearing lung carcinoma (Touil et al., 2011), prostate tumours (Khan et al., 2008), and human embryonal carcinoma (Tripathi et al., 2011). Its in vivo mechanism of action appears rather complex and includes antiangiogenic, antiandrogenic and anti-metastatic activities (Chien et al., 2010; Khan et al., 2008; Touil et al., 2011; Tripathi et al., 2011).

Despite its highly interesting properties for cancer therapy, fisetin administration in vivo remains problematic partly due to its poor water solubility (Guzzo et al., 2006; Mignet et al., 2012). Fisetin bioavailability must therefore be significantly improved in order to optimize its delivery to tumours after in vivo administration. Although the design of suitable molecular carriers for flavonoids is an area of intense research, solutions are still far from being developed for therapy, and suitable molecular carriers for flavonoids have yet to be designed and tested (Leonarduzzi et al., 2010). To

Abbreviations: Fisetin, 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone; EAhy 926, immortalized human umbilical vein endothelial cells; HLB, hydrophilic–lipophilic balance; HPLC, high performance liquid chromatography; PDI, polydispersity index.

* Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Chemical, Genetic & Imaging Pharmacology Laboratory (INSERM U1022 - CNRS UMR 8151), 4 Avenue de l'Observatoire, Paris F-75006, France. Tel.: +33 1 53 73 95 71; fax: +33 1 43 26 69 18.

E-mail address: guy.chabot@parisdescartes.fr (G.G. Chabot).

¹ Contributed equally to this study and are both considered as first author.

Table 1
Fisetin solubility in various solvents.

Solvents	Solubility (mg/g)
Water	<1
Ethanol	<14
<i>Long chain triglycerides</i>	
Soybean oil	<1
Carthame oil	<1
<i>Medium chain mono- di-or triglycerides</i>	
Miglyol® 812 N (capric and caprylic acid triglycerides)	<1
Captex® 355 (capric and caprylic acid triglycerides)	<1
Labrafac Lipophile WL 1349® (capric and caprylic acid triglycerides)	<1
Imwitor® 742 (capric and caprylic mono- di- and triglycerides)	<4
<i>Short chain triglycerides: Triacetin (triester of glycerol and acetic acid)</i>	<6
<i>Fatty acid esters: Ethyl oleate</i>	<1
Capmul® PG8 (propylene glycol monocaprylate)	<5
Capric acid	<1

Table 2
Fisetin solubility in various surfactants.

Surfactants	HLB ^a	Solubility (mg/g)
Span® 85 (sorbitan trioleate)	1.8	<2
Labrafil M 1944 CS® (glycerides and PEG 300 ester mixture)	4	<3
Capmul® MCM (mono diglyceride of capric and caprylic acids)	5	<7
Vitamin E TPGS (α tocopheryl acid succinate ester/PEG 1000)	13	<10
Cremophor EL® (polyethoxylated ricin oil)	13	<26
Myrj® 52 (polyoxyethylene glycol 2000 monostearate)	16.9	<30
Tween® 80 (polysorbate 80)	15	<30
Labrasol® (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides)	14	<54

^a HLB, hydrophilic–lipophilic balance (a value <10 indicates a majority of lipophilic fractions and a value >10 indicates a majority of hydrophilic fractions).

do so, we therefore chose to formulate fisetin into nanoemulsion in order to hopefully achieve a better bioavailability.

Nanoemulsions represent good vehicles to formulate hydrophobic active molecules (Sarker, 2005). For example, nanoemulsions are widely used for parenteral administration of lipids, and have also been employed for intravenous administration of anticancer drugs like paclitaxel (Kan et al., 1999) and chlorambucil (Ganta et al., 2008). Also noteworthy, nanoemulsion has also been recently reported to contribute to the in vivo increase in efficacy of anticancer drugs, e.g., dacarbazine (Tagne et al., 2008) and camptothecin (Han et al., 2009).

The aim of the present study was therefore to design and characterize a nanoemulsion of fisetin that could be suitable for parenteral administration. We also evaluated the fisetin nanoemulsion pharmacokinetics after intravenous (i.v.) or intraperitoneal (i.p.) administration in mice, and determined its relative i.p. bioavailability compared to the i.p. administration of the free fisetin. Finally, the antitumour activity of the fisetin nanoemulsion was compared to the administration of free fisetin in Lewis lung carcinoma bearing mice.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fisetin (98% purity) was purchased from Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China). The various purified oil phases were provided by the following companies: soybean oil (Société Industrielle des Oléagineux, Saint Laurent Blangy, France); carthame oil, ethyl oleate and n-capric acid (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France); Miglyol® 812N and Imwitor® 742 (Sasol Witten, Germany); Captex® 355 and Capmul® PG-8 (Abitec, Janesville, WI, USA); Labrafac lipophile WL 1349® (Gattefossé, Saint Priest, France); triacetin (VWR Fontenay-sous-Bois, France).

The surfactants were purchased from the following companies: egg lecithin containing 82.3% phosphatidylcholine (Lipoid E80®, Lipoid GmbH Ludwigshafen, Germany); polysorbate 80 (Tween® 80), sorbitan trioleate (Span 85®), polyoxyethylene glycol 2000 monostearate (Myrj® 52) (Uniquema, Everberg, Belgium); polyoxyethylenated ricin oil (Cremophor EL®, BASF, Ludwigshafen, Germany); vitamin E TPGS (Eastman Chemical B.V., Paris, France); a mixture of glycerides and esters of PEG-8 (Labrasol®), a mixture of glycerides and esters of PEG 300 (Labrafil M 1944 CS®) (Gattefossé Saint Priest, France); glycerol monocaprylocaprate (Capmul MCM®, Abitec, Janesville, WI, USA). Glycerol was purchased from Labosi (Paris, France). Sterile water for injection was from Fresenius-Kabi (Sèvres, France). Sodium hydroxide 0.1 N was from Carlo Erba Reactif SDS (Peypin, France).

The other chemicals used for drug dissolution, plasma preparation and HPLC analysis were the following: methanol, acetonitrile, perchloric acid (Carlo Erba Reactif SDS, Peypin, France); DMSO, PEG 200, morin, phosphate buffer (pH 7.4) and mouse serum (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). All other

Table 3
Fisetin solubility in various mixtures.

Mixtures (in percent)	Solubility (mg/g)
Ethanol/Tween® 80 (2%)	<21
Miglyol® 812N/Tween® 80 (2%)	<1
Soybean oil/Tween® 80 (15%)	<3
Soybean oil/Span 85® (10%)	<1
Miglyol® 812N/Span 85® (7.5%)	<3
Soybean oil/Labrasol® (50/50)	ND ^a
Miglyol® 812N/Labrasol® (50/50)	ND ^a
Capmul MCM®/Labrasol® (50/50)	<21
Tween® 80/Labrasol® (20/80)	<45
Tween® 80/Labrasol®/soybean oil (12/44/44)	ND ^a
Tween® 80/Labrasol®/Miglyol® 812 N (12/44/44)	<30
Mirj 52®/Solutol HS 15®/Capmul MCM® (57/29/14)	<24
Tween® 80/Labrasol®/Capmul MCM® (17/69/14)	<40

^a ND, not determined because the phases were not miscible in these proportions.

chemicals were of pharmaceutical grade or of the highest analytical purity available.

2.2. Fisetin solubility studies

Fisetin solubility was assessed according to the approached solubility method (Mulak and Cotty, 1975). Fisetin solubility was first separately assessed in different oil phases and surfactants, and thereafter in various mixtures of oil/surfactant (Tables 1–3). Increasing fisetin concentrations were introduced in the various phases under agitation and heating at $60 \pm 2^\circ\text{C}$ until a precipitate was observed. The solubility was determined after cooling at room temperature.

2.3. Nanoemulsion preparation

Fisetin was dissolved in several fractions in a mixture of Labrasol®/Tween® 80 heated at $60 \pm 2^\circ\text{C}$ under sonication (Sonifier® 450, Branson, Danbury, CT, USA). This mixture was added to the oil phase (Miglyol® 812) in which lecithin (Lipoid E80®) has previously been dispersed by heating. Aqueous and oil phases have been heated at $70 \pm 2^\circ\text{C}$ thereafter. Emulsification was accomplished by phase inversion (Becher, 1965), i.e., the aqueous phase was added to the oil phase. The mixture was then submitted to a high shear mixer (Ultraturrax® T25, Ika, Staufen, Germany) for 10 min at 21,500 rpm (set at 5) that allowed the formation of a crude emulsion. An additional 15 min sonication in the cold of the previous emulsion using a Sonifier® 450 set at 90% and output 3 allowed to obtain a submicron emulsion. For intravenous (i.v.) and intraperitoneal (i.p.) administration, sodium hydroxide 0.1 N was used to adjust pH to 7.0 and glycerol 2.25% was added to adjust tonicity. Two methods of sterilization were investigated: steam sterilization using 120°C , 15 min cycle and filtration through a $0.22\ \mu\text{m}$ filter.

2.4. Nanoemulsion characterization and stability studies

Nanoemulsions were visually inspected for eventual creaming, coalescence, phase separation and/or precipitation. After dilution (1/1000) in water, the mean droplet size, size distribution, the zeta potential (ζ), and the polydispersity index (PDI) were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Orsay, France). The PDI reflects the polydispersity of the emulsion ranging from 0 to 1, with lower values indicating a more monodispersed suspension. pH was determined using a pH meter 210 (MeterLab, Copenhagen, Denmark). A short term stability of the optimized formulations over a period of 30 days was accomplished at room temperature ($+20 \pm 2^\circ\text{C}$) and at $+4^\circ\text{C}$ by evaluating the above mentioned parameters. Measurements were performed in triplicate.

For the determination of the fisetin concentration, nanoemulsions were diluted (1/2000) in methanol, vortexed, and $100\ \mu\text{L}$ were injected onto a reversed-phase HPLC system (Shimadzu CLASS-VP®, version 5.3), equipped with an octadecylsilane column (Beckman Ultrasphere ODS, $5\ \mu\text{m}$; $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$) thermostated at 20°C , and a UV detector set at 360 nm. The mobile phase was composed of 25% acetonitrile and 75% acidified water (2% (v/v) glacial acetic acid), at a flow rate of 1 mL/min. In these conditions the retention time of fisetin was 8 min. The area of the fisetin peak was reported to a calibration curve to determine the concentration of fisetin. Calibration curves were linear with correlation coefficients near unity.

2.5. Effect of fisetin nanoemulsion on endothelial cells

Immortalized human endothelial cells (EAhy 926) (Edgell et al., 1983) were grown in DMEM containing 2 mM L-glutamine, 10%

foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and $100\ \mu\text{g/mL}$ streptomycin (37°C , 5% CO_2). Cells were plated onto 96-well plates at 5000 cells per well in $100\ \mu\text{L}$ of culture medium. The fisetin-free nanoemulsion or the fisetin nanoemulsion were added to the cells for a 2 h exposure time, and the cell morphology was assessed under microscopy at a magnification of X100 (Nikon Diaphot, Nikon Corp., Japan).

2.6. Fisetin pharmacokinetics in mice

2.6.1. Mice and treatments

Female 8 weeks old C57BL/6J mice (body weight 18–22 g), were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). After an overnight fasting period, mice were administered the various treatments as described hereafter. For the intravenous (i.v.) administration into the tail vein, 21 mice received the free fisetin formulated in 20% DMSO, 20% PEG 200 and 60% saline at a final concentration of $1.3\ \text{mg/mL}$ (hereafter referred as “free fisetin”). The total volume injected i.v. was $200\ \mu\text{L}$ for a 20 g mouse, which corresponds to a volume of DMSO of $40\ \mu\text{L}$. It should be noted that an undiluted DMSO volume of $50\ \mu\text{L}$ can be administered safely i.v. to mice without toxicity (Willson et al., 1965), and that in our studies, the final DMSO dose per mouse corresponds to $40\ \mu\text{L}$ (for a 20 g mouse), which was further diluted in saline and injected slowly over 1 min. We did not encounter any acute mortality using this formulation in our studies.

A second group of 21 mice received the fisetin nanoemulsion in a final volume of $50\ \mu\text{L}$, previously sterilized by filtration through $0.22\ \mu\text{m}$ filters. The fisetin dose was $13\ \text{mg/kg}$ for the free fisetin or its nanoemulsion. Mice were sacrificed at 5, 10, 15, and 30 min, 1, 2, and 4 h, the blood was obtained by cardiac puncture onto heparinized syringes, centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min), and the harvested plasma was kept frozen at -20°C until HPLC analysis. For the intraperitoneal (i.p.) administration, the free fisetin (prepared as described above for the i.v. route) was injected at the maximum tolerated dose by this route ($223\ \text{mg/kg}$). The fisetin nanoemulsion dose was $112.5\ \text{mg/kg}$ corresponding to an injected volume of $450\ \mu\text{L}$ i.p. Three mice per time point were sacrificed at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 15 and 24 h to harvest the blood by cardiac puncture (heparinized syringe). Plasma was obtained by centrifugation ($10,000 \times g$, 10 min), and frozen at -20°C until HPLC analysis. All animal experiments have been carried out in accordance with institutional and French regulations concerning the protection of animals, and with the European Commission regulations.

2.6.2. Determination of fisetin concentration in plasma

Fisetin concentration in plasma was determined by HPLC as followed: to $100\ \mu\text{L}$ of plasma was added $60\ \mu\text{L}$ of a morin methanolic solution at $0.5\ \text{mg/mL}$ (internal standard), and $200\ \mu\text{L}$ of cold acidified methanol (methanol:perchloric acid 70%, 200:1, v:v) to precipitate proteins. After vortexing for 5 min the samples were kept on ice for 15 min, and centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C . The supernatant ($100\ \mu\text{L}$) was injected onto a reversed-phase HPLC system as described above with the UV detector set at 360 nm. The ratio of the area of the fisetin peak divided by the internal standard peak area was reported to a calibration curve to determine the concentration of fisetin. Calibration curves were linear with correlation coefficients near unity. The quantification limit of the system was $0.1\ \mu\text{g/mL}$.

2.6.3. Pharmacokinetic parameters determination

The following non compartmental pharmacokinetic parameters were calculated using standard methods (Gibaldi and Perrier, 1982): maximum concentration (C_{max}) extrapolated to time zero for the i.v. route; area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the time of the last measurable

concentration (AUC_{0-t}) calculated by the trapezoidal method; terminal half-life = $\ln 2/K_{el}$, where K_{el} is the terminal elimination rate constant. The mean residence time (MRT) was calculated as the $AUMC/AUC$, where AUMC is the area under the first moment curve. Clearance was calculated as the dose/AUC, and the volume of distribution V_{ss} as the $CL \times MRT$. The mean absorption time (MAT) after i.p. administration was calculated as the $MRT_{i.p.}$ minus $MRT_{i.v.}$ (Gibaldi and Perrier, 1982). Relative bioavailability (F_{REL}) comparing the free fisetin and its nanoemulsion for the same route of administration was determined by the following formula: $F_{REL} = (AUC_{NE} \times dose_{FREE}) / (AUC_{FREE} \times dose_{NE})$.

2.7. Evaluation of antitumour activity in mice

Female 8 weeks old C57BL/6J mice (body weight 18–22 g) (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were used for antitumour evaluation. Lewis lung tumour fragments (about 2 mm diameter) were implanted subcutaneously (s.c.) bilaterally into mouse flanks using a 12 gauge trocar. Four days after tumour implantation, the mice were submitted to the following i.p. treatments (4 mice per group) for 12 consecutive days (days 4–15): 4 control mice received a fisetin-free nanoemulsion; 4 mice received the fisetin nanoemulsion corresponding to 18.3 mg/kg of fisetin; and, 4 mice were injected the fisetin nanoemulsion at 36.6 mg/kg. Tumour growth was assessed using caliper bi-dimensional measurements (in mm) and the tumour volume (mm^3) was calculated according to the following formula: $(width^2 \times length)/2$.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Comparison between tumour volumes was assessed by the Student *t* test.

3. Results

3.1. Fisetin solubility in various solvents

Table 1 presents the solubility of fisetin in various solvents. Fisetin was not soluble in water (<1 mg/g) and was weakly soluble in ethanol (<14 mg/g). Fisetin was also found weakly soluble for all the oil phases tested, with a maximum solubility value <6 mg/g for triacetin and <5 mg/g for propylene glycol monocaprylate.

Table 2 shows fisetin solubility in frequently used surfactants. In lipophilic surfactants (low HLB value), fisetin solubility was low, whereas its solubility was markedly increased in hydrophilic surfactants with high HLB values. The best surfactant was found to be Labrasol® which could solubilize up to 54 mg/g of fisetin.

Finally, the solubility values of fisetin using several combinations of oils and surfactants in various proportions are presented in Table 3. It was found that the mixture composed of Tween® 80 and Labrasol® (20/80) could solubilize fisetin most efficiently up to a maximal concentration of 45 mg/g.

3.2. Development of a fisetin nanoemulsion

3.2.1. Emulsification capacity

Several nanoemulsion formulations were thereafter tested for their emulsification capacity and 3 cases could be observed, as follows (Table 4): (a) no emulsification was obtained for certain formulations lacking Lipoid® E80 (e.g., formulations 3–7) or containing soybean oil and Capmul® MCM, as in formulation 2; (b) formation of a nanoemulsion was observed for formulations 1, 8 and 9; (c) and, formulation 10 allowed the formation of a clear solution.

3.2.2. Fisetin incorporation into nanoemulsion formulations

We have next evaluated the maximum quantity of fisetin that could be incorporated into each nanoemulsion (formulations 1, 8, 9), or solution (formulation 10). Table 4 shows that formulation 1 could incorporate only 1 mg/g of fisetin, whereas formulations 8 and 9 allowed the incorporation of 5 mg/g of the flavonoid. These formulations were found visually stable on day 1. Although formulation 10 allowed to solubilize up to 16 mg/g of fisetin due to its higher content in Labrasol® and Tween® 80, it was unfortunately found to precipitate on day 1 for concentrations of 8 and 16 mg/g, but was found stable for a fisetin concentration of 4 mg/g.

3.2.3. Choice of final fisetin nanoemulsion formulation

Considering the above results, formulations 8 and 9 were therefore considered a good compromise between fisetin content and nanoemulsion stability. These formulations were further tested for their particle diameter and polydispersity index (PDI) and it was observed that preparation 8 containing soybean oil yielded a nanoparticle diameter of 323 ± 2 nm with a PDI of 0.153, whereas preparation 9 containing Miglyol® 812N showed a nanoparticles diameter of 146 ± 3 nm and a PDI of 0.015. Formulation 9 was therefore chosen for further in vitro and in vivo testing because of its good fisetin content, its nanoparticle size and low PDI value. The final composition of nanoemulsion 9 containing 5 mg/mL of fisetin was therefore as follows: Miglyol® 812N (10%), Labrasol® (10%), Tween® 80 (2.5%), Lipoid E80® (1.2%), glycerol (2.25%), NaOH (0.1 N) to adjust to pH 7, water to 100%.

3.3. Stability of the fisetin nanoemulsion

We next performed short term stability studies of the fisetin nanoemulsion (preparation 9) over a period of 30 days at room temperature (20°C) and at 4°C (Table 5) by evaluating particle diameter, pH, zeta potential and the PDI.

Droplet size of nanoemulsion 9 stored at 20°C increased markedly as a function of time until phase separation occurred on day 30, whereas for the 4°C storage condition, particle diameter remained relatively stable for the 30 day examination period. A slight decrease in pH was noted at both storage temperatures. For the zeta potential, negative values were observed and remained stable over 30 days for the 4°C storage condition. The PDI presented an important increase over time at 20°C, whereas it was found stable and relatively low at 4°C. In order to be administered via parenteral routes, we also checked if the nanoemulsion could sustain standard steam sterilization conditions (121°C for 15 min) but this resulted in phase separation. However, sterilization of nanoemulsion 9 has been successfully carried out using a 0.22 µm filter with preservation of homogeneity and size characteristics.

3.4. Effect of fisetin nanoemulsion on endothelial cells

Free fisetin has been reported to exert a distinct morphological effect on endothelial cells that is characterized by the rapid development of pseudopods at non cytotoxic concentrations (Touil et al., 2009). We therefore tested if the fisetin nanoemulsion (preparation 9) could exert the same morphological effects on Eahy 926 endothelial cells to verify if the active principle is indeed released from the pharmaceutical preparation. Fig. 1A depicts control endothelial cells exposed to 1% DMSO which show typical cobblestone appearance, whereas exposure to free fisetin led to the expected pseudopods formation (Fig. 1B). Endothelial cells exposed to control nanoemulsion without fisetin resemble normal control endothelial cells (Fig. 1C), whereas the pseudopods are indeed observed in the cells exposed to the fisetin nanoemulsion (Fig. 1D). This observation indicates that fisetin is indeed released from the

Table 4

Composition of the various emulsions.

Component	Formulation number									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Soybean oil	10	10	20	–	–	–	–	10	–	–
Miglyol® 812N	–	–	–	10	10	15	20	–	10	–
Triacetin	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Capmul MCM®	–	10	–	–	–	–	–	–	–	6
Labrasol®	–	–	20	10	9.6	14.4	19.2	10	10	27
Tween® 80	2.5	2.5	–	2.5	0.4	0.6	0.8	2.5	2.5	7
Lipoid E80®	1.2	1.2	–	–	–	–	–	1.2	1.2	–
Water	76.3	76.3	60	77.5	80	70	60	76.3	76.3	60
Observations	NE ^a	LOE ^b	LOE ^b	LOE ^b	LOE ^b	LOE ^b	LOE ^b	NE ^a	NE ^a	Sol. ^c
Fisetin incorporation on day 1 (mg/g)	1							5	5	4

^a NE, nanoemulsion.^b LOE, lack of emulsification.^c Sol., clear solution.**Table 5**

Fisetin nanoemulsion (preparation 9) stability parameters.

Parameter	Day					
	0	1	4	7	15	30
Diameter (nm) 20 °C	153 ± 2 ^a	189 ± 1	331 ± 7	749 ± 54	2882 ± 87	Phase separation
Diameter (nm) 4 °C	138 ± 5	138 ± 0	152 ± 4	144 ± 2	147 ± 2	154 ± 2
pH at 20 °C	7.11 ± 0.01	6.80 ± 0.02	6.61 ± 0.02	6.51 ± 0.02	6.42 ± 0.01	–
pH at 4 °C	7.09 ± 0.01	6.79 ± 0.02	6.81 ± 0.02	6.65 ± 0.03	N.D.	6.53 ± 0.01
Zeta potential, ζ , 20 °C (mV)	–28.4 ± 0.6	–30.8 ± 0.9	–34.8 ± 1.4	–40.3 ± 0.4	–39.9 ± 0.5	–
Zeta potential, ζ , 4 °C (mV)	–32.7 ± 1.1	–26.7 ± 1.0	–33.5 ± 0.5	–34.7 ± 1.6	–32.5 ± 2.9	–34.1 ± 2.5
PDI ^b 20 °C	0.129	0.090	0.201	0.371	1.000	–
PDI ^b 4 °C	0.151	0.157	0.136	0.128	0.147	0.115

^a Mean ± SEM of 3 determinations.^b PDI, polydispersity index.

nanoemulsion and can exert similar morphological effects as the free fisetin on endothelial cells.

3.5. Fisetin nanoemulsion pharmacokinetics in mice

The developed fisetin nanoemulsion (preparation 9) was next administered *in vivo* to evaluate its pharmacokinetics in mice. We

first examined the intravenous route (*i.v.*) by injecting the free fisetin formulation or its nanoemulsion at a dose of 13 mg/kg. We noted a very similar pharmacokinetic profile between the two formulations with plasma concentrations versus time curves almost superimposable (Fig. 2). Indeed, similar pharmacokinetic parameters in terms of C_{max} , AUC and terminal half-life were observed for both formulations (Table 6). The *i.v.* route administration of the

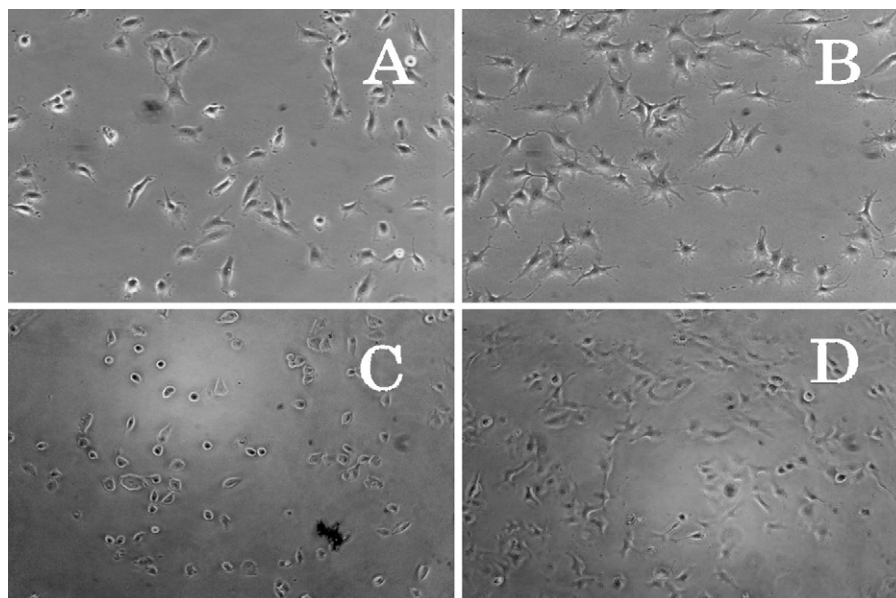


Fig. 1. Morphologic effects of fisetin on Eahy 926 endothelial cells after a 2 h exposure period. (A) Control with 1% DMSO; (B) free fisetin (25 µg/mL); (C) fisetin-free nanoemulsion (0.25%); (D) fisetin nanoemulsion 12.5 µg/mL. Original magnification, 100×.

Table 6

Fisetin pharmacokinetic parameters after intravenous or intraperitoneal administration of free fisetin and fisetin nanoemulsion in mice (preparation 9).

Parameter	Intravenous		Intraperitoneal	
	Free fisetin	Fisetin nanoemulsion	Free fisetin	Fisetin nanoemulsion
Dose (mg/kg)	13	13	223	112.5
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	6.0	5.3	2.53	22.96
Elimination constant, K_{el} (h^{-1})	1.136	1.072	0.165	0.226
Terminal half-life (h)	0.61	0.65	4.19	3.07
$AUC_{0 \rightarrow t}$ ($\mu\text{g h/mL}$)	1.12	1.13	4.07	48.53
AUMC ($\mu\text{g h}^2/\text{mL}$)	1.09	1.12	28.26	143.56
Mean residence time (MRT) (h)	0.97	0.99	6.95	2.96
Mean absorption time (MAT) (h)	–	–	5.98	1.97
Clearance (CL) (L/kg/h)	11.64	11.50	54.80	2.32
Volume of distribution, V_{ss} (L/kg)	11.33	11.36	380.62	6.86
Relative bioavailability, F_{rel}	–	–	1	24

$$^a F_{rel} = (AUC_{NE} \times \text{dose}_{FREE}) / (AUC_{FREE} \times \text{dose}_{NE}).$$

fisetin nanoemulsion was however found relatively toxic, because we noted a mortality rate of 3/21 mice (14%), apparently due to the rapid administration.

In order to avoid the acute toxicity of the i.v. administration, we next explored the intraperitoneal (i.p.) route. For the fisetin nanoemulsion, a comparison of its pharmacokinetics after i.p. administration with the free fisetin injected by the same route is presented in Fig. 3. Compared to the i.p. administration of the free fisetin, it can be seen that the injection of the fisetin nanoemulsion led to a significant increase in fisetin plasma concentrations, even at a fisetin nanoemulsion dose (112.5 mg/kg) half that of the free fisetin dose (223 mg/kg). The pharmacokinetic parameters presented in Table 6 indicate that not only the maximum plasma concentrations reached were higher for the nanoemulsion, but the relative bioavailability was 24-fold higher compared to the free fisetin. This increase in bioavailability with the nanoemulsion appears to be due to a faster absorption with this drug formulation as shown by a shorter mean absorption time (MAT) of 1.97 h compared to 5.98 h for the free fisetin. It is also noteworthy that following the i.p. administration of the fisetin nanoemulsion, no mortality was observed.

3.6. Fisetin nanoemulsion antitumour activity in mice

We were next interested to evaluate the antitumour activity of the developed fisetin nanoemulsion (preparation 9) in Lewis lung carcinoma bearing mice. A group of 4 control mice received the empty nanoemulsion and 2 other groups of 4 mice received the fisetin nanoemulsion at an equivalent dose of fisetin of 18.3 and 36.6 mg/kg administered i.p. for 12 days starting on day 4 post tumour implantation. Results depicted in Fig. 4 show that the

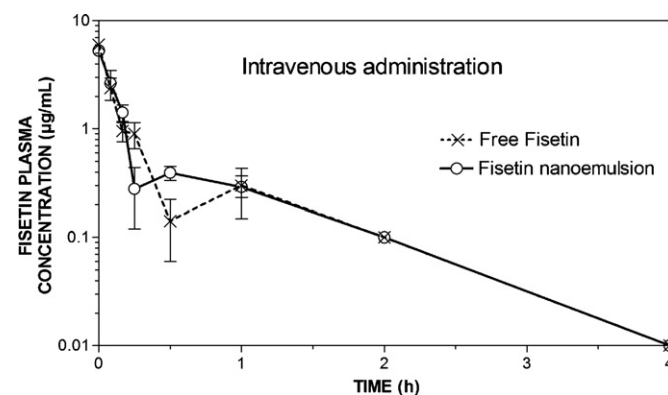


Fig. 2. Fisetin pharmacokinetics in mice after intravenous administration of free fisetin (dotted line) at 13 mg/kg, and after the intravenous administration of fisetin nanoemulsion at 13 mg/kg (solid line). Error bars, SEM.

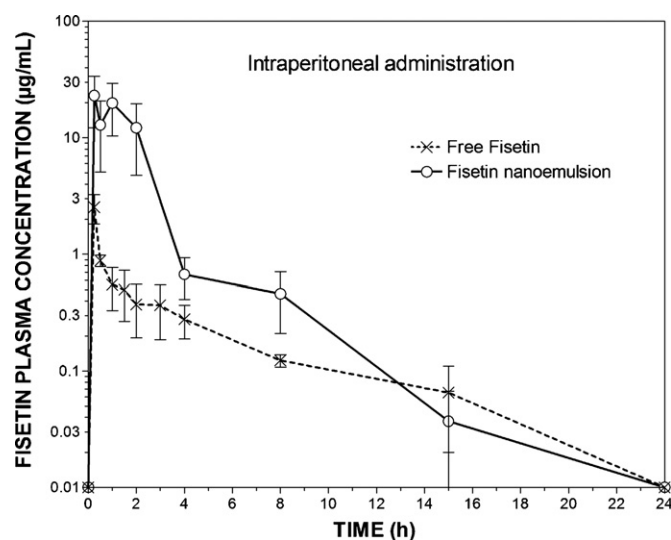


Fig. 3. Fisetin pharmacokinetics in mice after intraperitoneal administration of free fisetin (dotted line) at 223 mg/kg, and after intraperitoneal administration of fisetin nanoemulsion at 112.5 mg/kg (solid line). Mean $\pm$ SEM.

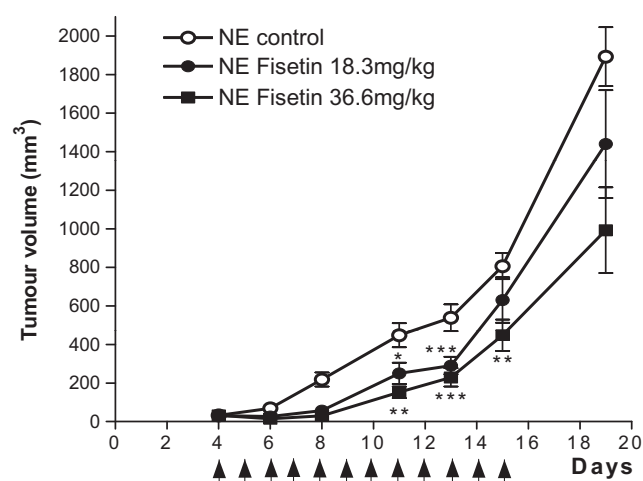


Fig. 4. Antitumour activity of the nanoemulsion of fisetin. Lewis carcinoma bearing mice received the fisetin nanoemulsion (NE Fisetin) by intraperitoneal injection at 18.3 and 36.6 mg/kg for 12 consecutive days (indicated by arrows). Control mice received the nanoemulsion without fisetin (NE control). The asterisks represent a P value significant at 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.005 (***) level. Mean $\pm$ SEM of 8 tumours per time point.

fisetin nanoemulsion can significantly inhibit tumour growth in a dose-dependent manner, even at these relatively low dose levels of fisetin.

4. Discussion

The main objectives of this study were to develop a nanoemulsion of the hydrophobic flavonoid fisetin, determine its pharmacokinetics in mice, and evaluate its anticancer activity *in vivo*. The first problems encountered were the low fisetin solubility in the classical oil phases usually employed in formulation, e.g., soybean oil or medium chain triglycerides (Date and Nagarsenker, 2008). The best solubility was observed with triacetin, a short chain triglyceride composed of triester of glycerol and acetic acid. However, triacetin does not exhibit remarkable emulsifying properties (Poullain-Termeau et al., 2008). Fisetin was also found weakly soluble in lipophilic surfactants, but was more soluble in hydrophilic surfactants. As a matter of fact, the maximum solubility was observed with Labrasol®, a mixture of triglycerides and polyethylene glycol esters possessing a hydrophilic–lipophilic balance of 14. We did not observe any synergistic effect between the oil phase and surfactant, be it hydrophilic or lipophilic. Hence, the fisetin low solubility in lipid phases leads to a weak association of the active principle in this phase and therefore requires more solubilising surfactant, as previously reported for a nanoemulsion of carbamazepine (Kelmann et al., 2007). We finally found that the best mixture was the one composed of Labrasol®/Tween® 80 which allowed to achieve an acceptable fisetin concentration of 5 mg/mL.

Although Labrasol® has already been employed in injectable preparations (Nornoo et al., 2008), no standard preparation has been developed so far, to our knowledge, with this proprietary formulation. Labrasol® is mostly used in auto-emulsifying systems for oral administration (Kommuru et al., 2001) and it has been shown to increase oral absorption of hydrophilic drugs, e.g., gentamicin (Hu et al., 2001). Available toxicity data on Labrasol® show that it is relatively non toxic when given orally to rats with a LD50 of 22 g/kg (Gad et al., 2006). However, acute toxicity data are not available for the intravenous or intraperitoneal routes. In our experiments, a mortality rate of 14% was noted for the i.v. route, whereas no mortality was observed for the i.p. route. The other components of the nanoemulsion are not likely to contribute to acute toxicity because medium chain triglycerides (e.g., Miglyol® 812N) and lecithins are already widely used in injectable preparations. Tween® 80 can also be ruled out in this toxicity because it is frequently used at high concentrations, e.g., 25% in docetaxel preparation without apparent toxicity (Strickley, 2004). Therefore, a compromise will have to be found between the toxicity of the excipient and the final concentration in fisetin.

With regard to the physico-chemical properties of the fisetin nanoemulsion, it was found that the preparation containing Miglyol® 812N (No. 9) showed acceptable fisetin content, nanoparticle size and PDI. This fisetin nanoemulsion was found to be unstable at room temperature with increasing diameter and PDI values over time, with phase separation occurring on day 30. This relatively slow process could be explained by the Ostwald ripening in which larger particles grow at the expense of smaller ones due to the higher solubility of the smaller particles and to molecular diffusion through the continuous phase (Capek, 2004). This phenomenon finally ends up in the coalescence of the emulsion (Tadros et al., 2004). Because this phenomenon is temperature sensitive, it was noted that nanoemulsions kept at 4 °C were remarkably stable with almost unchanged particle diameter and PDI over the 30 day examination period. PDI smaller than 0.250 are considered acceptable for parenteral preparations (Müller et al., 2004). However, it was also noted, as expected, that the

nanoemulsion was particularly unstable in steam sterilization conditions (121 °C, 15 min) probably due to the non-ionic surface active agents which are not stable at high temperatures (Nornoo et al., 2008). To overcome this problem, sterilization by filtration could therefore be employed for nanoemulsions (Floyd, 1999). The formulated fisetin nanoemulsion presented a negative zeta potential which is probably due to the anionic fractions of the employed lecithin (Wang et al., 2006).

We have observed that fisetin nanoemulsion could exert its distinct morphological effects on endothelial cells similar to the free fisetin (Touil et al., 2009) indicating that fisetin could be released from its nanoemulsion formulation. These morphological changes on endothelial cells are attributed to a stabilization of the cytoskeleton as previously shown by increased acetylated alpha tubulin (Touil et al., 2009).

Concerning the i.v. administration of the free fisetin and its nanoemulsion, we did not observe any pharmacokinetic difference, as expected for a classical emulsion, contrary to what is observed for a pegylated formulation which can increase the residence time (Reddy and Venkateswarlu, 2005). As a matter of fact, upon injection of a classical emulsion, the particles interact with the apolipoproteins and are captured by the reticulo-endothelial system leading to their rapid elimination from the blood compartment (Kawakami et al., 2000). One possibility to increase the residence time using the i.v. administration would be to pegylate the emulsion that could increase the surface hydrophilic properties by forming a steric barrier that could result in a longer retention time in plasma (Tamilvanan, 2004).

We demonstrated that the i.p. administration of the fisetin nanoemulsion led to a significant improvement in bioavailability compared to the i.p. administration of the free fisetin, with a 24-fold increase in relative bioavailability compared to the free fisetin administered via the same route. This could be due to a faster absorption phase from the peritoneal cavity with the nanoemulsion compared to free fisetin. As a matter of fact, the mean absorption time was shorter with the nanoemulsion (2 h) compared to the free fisetin (6 h). Similar results were reported for the hydrophobic taxoid paclitaxel where i.p. administration was leading to a significant improvement in bioavailability compared to the i.v. administration (Soma et al., 2009). In addition, this enhanced bioavailability of the fisetin nanoemulsion is also probably resulting from the unique lymphatic distribution after i.p. administration which is a favourable property, especially with anticancer drugs that must access lymph nodes which are frequently harbouring metastases (Nishioka and Yoshino, 2001).

We also demonstrated that the fisetin nanoemulsion could elicit a significant antitumour activity *in vivo* in Lewis lung tumour bearing mice. It is noteworthy that a relatively low dose of the fisetin nanoemulsion corresponding to 36.6 mg/kg of fisetin was able to reduce by 53% the tumour volume, whereas a 6-fold higher dose (223 mg/kg) was required to obtain a similar tumour growth inhibition with the free fisetin, as recently reported by Touil et al. (2011). This indicates that the nanoemulsion of fisetin is favourable to its anticancer action *in vivo* probably by increasing its bioavailability, as shown in this study.

5. Conclusion

In conclusion, we have developed a nanoemulsion of fisetin that allowed to solubilize a relatively high concentration of fisetin (5 mg/mL), thanks to the use of two surface active agents, i.e., Tween® 80 and Labrasol®. However the latter agent appeared to be relatively toxic when using the i.v. route, but was not found toxic by the i.p. route. The developed fisetin nanoemulsion could also markedly increase the bioavailability of fisetin after i.p.

administration and was also found to significantly improve its anti-tumoral activity in tumour bearing mice compared to the free fisetin. The developed nanoemulsion of fisetin could therefore advantageously be employed to improve the antiangiogenic and anticancer activities of this flavonoid, as well as other flavonoids sharing the same problems of in vivo administration.

Acknowledgements

This research was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by a grant from the Institut National du Cancer (INCa, Boulogne-Billancourt, France).

References

- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N., 2000. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* 130, 2243–2250.
- Becher, P., 1965. Technique of emulsification. In: *Emulsions: Theory and Practice*. Reinhold Publishing Corp, New York, pp. 267–325.
- Böhl, M., Tietze, S., Sokoll, A., Madathil, S., Pfennig, F., Apostolakis, J., Fahmy, K., Gutzeit, H.O., 2007. Flavonoids affect actin functions in cytoplasm and nucleus. *Biophys. J.* 93, 2767–2780.
- Capek, I., 2004. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 107, 125–155.
- Chien, C.S., Shen, K.H., Huang, J.S., Ko, S.C., Shih, Y.W., 2010. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 169–180.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A., Moon, R., 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure–activity relationships. *J. Nat. Prod.* 58, 217–225.
- Date, A.A., Nagarsenker, M.S., 2008. Parenteral microemulsions: an overview. *Int. J. Pharm.* 355, 19–30.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3734–3737.
- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Technol. Today* 4, 134–143.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 2916–2921.
- Gad, S.C., Cassidy, C.D., Aubert, N., Spainhour, B., Robbe, H., 2006. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species. *Int. J. Toxicol.* 25, 499–521.
- Ganta, S., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S., 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. *Int. J. Pharm.* 360, 115–121.
- Gibaldi, M., Perrier, D., 1982. Noncompartmental analysis based on statistical moment theory. In: *Swarbrick, J. (Ed.), Pharmacokinetics*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 409–417.
- Guzzo, M.R., Uemi, M., Donate, P.M., Nikolaou, S., Machado, A.E., Okano, L.T., 2006. Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A* 110, 10545–10551.
- Han, M., He, C.X., Fang, Q.L., Yang, X.C., Diao, Y.Y., Xu, D.H., He, Q.J., Hu, Y.Z., Liang, W.Q., Yang, B., Gao, J.Q., 2009. A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* 26, 926–935.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67–202.
- Hu, Z., Tawa, R., Konishi, T., Shibata, N., Takada, K., 2001. A novel emulsifier, labrasol, enhances gastrointestinal absorption of gentamicin. *Life Sci.* 69, 2899–2910.
- Jankun, J., Selman, S.H., Aniola, J., Skrzypczak-Jankun, E., 2006. Nutritional inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol. Rep.* 16, 341–346.
- Kan, P., Chen, Z.B., Lee, C.J., Chu, I.M., 1999. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J. Control. Release* 58, 271–278.
- Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M., 2000. Disposition characteristics of emulsions and incorporated drugs after systemic or local injection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45, 77–88.
- Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2007. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int. J. Pharm.* 342, 231–239.
- Khan, N., Asim, M., Afaq, F., Abu, Z.M., Mukhtar, H., 2008. A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res.* 68, 8555–8563.
- Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K., Watanabe, S., 1998. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.* 8, 168–175.
- Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K., 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int. J. Pharm.* 212, 233–246.
- Leonarduzzi, G., Testa, G., Sottero, B., Gamba, P., Poli, G., 2010. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 17, 74–95.
- Lopez-Lazaro, M., 2002. Flavonoids as anticancer agents: structure–activity relationship study. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2, 691–714.
- Lu, H., Chang, D.J., Baratte, B., Meijer, L., Schulze-Gahmen, U., 2005a. Crystal structure of a human cyclin-dependent kinase 6 complex with a flavonol inhibitor, fisetin. *J. Med. Chem.* 48, 737–743.
- Lu, X., Jung, J., Cho, H.J., Lim, D.Y., Lee, H.S., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H., 2005b. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* 135, 2884–2890.
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751.
- Mignet, N., Seguin, J., Ramos Romano, M., Brullé, L., Touil, Y.S., Scherman, D., Bessodes, M., Chabot, G.G., 2012. Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. *Int. J. Pharm.* 423, 69–76.
- Mulak, G., Cotty, J., 1975. Solubilité et constante diélectrique. *Sci. Technol. Pharm.* 4, 281–288.
- Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, L., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S., 2004. SolEmuls-novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 269, 293–302.
- Nishioka, Y., Yoshino, H., 2001. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 55–64.
- Nornoo, A.O., Osborne, D.W., Chow, D.S., 2008. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: formulation, cytotoxicity and hemolysis. *Int. J. Pharm.* 349, 108–116.
- Olaharski, A.J., Mondrala, S.T., Eastmond, D.A., 2005. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutat. Res.* 582, 79–86.
- Park, H.H., Lee, S., Oh, J.M., Lee, M.S., Yoon, K.H., Park, B.H., Kim, J.W., Song, H., Kim, S.H., 2007. Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacol. Res.* 55, 31–37.
- Poullain-Termieu, S., Crauste-Manciet, S., Brossard, D., Muhamed, S., Nicolaos, G., Farinotti, R., Barthelemy, C., Robert, H., Odou, P., 2008. Effect of oil-in-water submicron emulsion surface charge on oral absorption of a poorly water-soluble drug in rats. *Drug Deliv.* 15, 503–514.
- Reddy, P.R., Venkateswarlu, V., 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of etoposide delivered in long circulating parenteral emulsion. *J. Drug Target.* 13, 543–553.
- Sarker, D.K., 2005. Engineering of nanoemulsions for drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2, 297–310.
- Soma, D., Kitayama, J., Ishigami, H., Kaisaki, S., Nagawa, H., 2009. Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration. *J. Surg. Res.* 155, 142–146.
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 21, 201–230.
- Sung, B., Pandey, M.K., Aggarwal, B.B., 2007. Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkkappaBalpha kinase activation. *Mol. Pharmacol.* 71, 1703–1714.
- Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3, 768–780.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109, 303–318.
- Tagne, J.B., Kakumanu, S., Nicolosi, R.J., 2008. Nanoemulsion preparations of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft mouse melanoma model. *Mol. Pharm.* 5, 1055–1063.
- Tamilvanan, S., 2004. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Prog. Lipid Res.* 43, 489–533.
- Touil, Y.S., Fellous, A., Scherman, D., Chabot, G.G., 2009. Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr. Cancer* 61, 310–321.
- Touil, Y.S., Seguin, J., Scherman, D., Chabot, G.G., 2011. Improved antiangiogenic and antitumor activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 445–455.
- Tripathi, R., Samadder, T., Gupta, S., Surolia, A., Shaha, C., 2011. Anticancer activity of a combination of cisplatin and fisetin in embryonal carcinoma cells and xenograft tumors. *Mol. Cancer Ther.* 10, 255–268.
- Wang, J.J., Sung, K.C., Hu, O.Y., Yeh, C.H., Fang, J.Y., 2006. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J. Control. Release* 115, 140–149.
- Willson, J.E., Brown, D.E., Timmens, E.K., 1965. A toxicologic study of dimethyl sulfoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 104–112.
- Woodman, O.L., Chan, E.C., 2004. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 786–790.

Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée

Résumé

La première partie de ce travail de thèse a permis de sélectionner parmi un panel de 15 tumeurs murines, les modèles les plus appropriés pour l'étude de molécules à potentiel anti-angiogénique. Deux tumeurs ont été choisies, la tumeur de poumon (Lewis Lung carcinoma, LLC) pour laquelle une forte vascularisation a été observée et la tumeur de côlon (colon tumor 26, C26) pour laquelle l'expression des intégrines $\alpha\beta 3$ et de la sélectine-E a été observée. Les modèles de côlon C26 implantés en sous-cutané (ectopique) et sur le caecum (orthotopique) ont été développés et caractérisés par différentes modalités d'imagerie. L'imagerie optique s'est montrée adaptée uniquement pour la détection précoce des tumeurs, tandis que l'imagerie par résonance magnétique et l'imagerie par ultrason se sont avérées des techniques très adaptées pour le suivi de la croissance des tumeurs implantées en ectopique et en orthotopique. Le développement et la caractérisation de ces modèles se sont révélés très utiles pour la deuxième partie de nos travaux, notamment pour l'évaluation antitumorale d'un flavonoïde la fisétine.

La fisétine est un flavonoïde naturel (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) ayant montré une activité anti-angiogénique et des propriétés anticancéreuses. Etant donné sa faible solubilité dans l'eau, une forme liposomale a été développée afin de faciliter son administration systémique. La compatibilité de la formulation fisétine avec les milieux biologiques et son coût de production, ont été pris en compte. Une taille nanométrique (173.5 ± 2.4 nm), une haute homogénéité (index de polydispersité 0.181 ± 0.016) et un fort taux d'encapsulation (58 %) ont été obtenus pour la formulation DOPC/Chol/DODA-PEG2000. Les résultats *in vitro* ont montré que cette formulation conserve les propriétés de la fisétine en terme de cytotoxicité et de morphologie sur différentes lignées cellulaires. L'encapsulation de la fisétine dans un liposome a également permis d'augmenter la biodisponibilité de la fisétine en comparaison avec la fisétine libre. De plus, une efficacité antitumorale plus importante de la fisétine liposomale comparée à la fisétine libre a été obtenue après injection d'une faible dose (21 mg/kg) sur la lignée tumorale LLC. Cette formulation pourrait donc avantageusement être employée pour la formulation de composés de la famille des flavonoïdes.

Summary

The first part of this study was to assess and compare fifteen widely used tumour models to select the ones most suitable for angiogenesis research. Two tumours were selected: a lung tumour (Lewis lung carcinoma, LLC) for its high vascularization and a colon carcinoma (colon tumour 26, C26) because it expresses both integrin $\alpha\beta 3$ and E-selectin. CT26 tumours were implanted subcutaneously (s.c.) in Balb/c mice for the ectopic model, or into the caecum for the orthotopic model. Tumours were evaluated by histology, spectrofluorescence, bioluminescence (BLI), magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasound imaging (US). BLI was found to be more appropriate for early tumour detection, whereas MRI and US afforded excellent non invasive imaging techniques to accurately follow tumour growth of both ectopic and orthotopic tumour models. These models were very useful to investigate antiangiogenic therapies, in particular during the preclinical development of fisetin as an antiangiogenic agent.

The natural flavonoid fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) has been shown to possess antiangiogenic and anticancer properties. Because of the limited water solubility of fisetin, our aim was to design and optimize a liposomal formulation that could facilitate its *in vivo* administration. A liposomal formulation was developed with DOPC and DODA-PEG2000, possessing a diameter in the nanometer scale (173.5 ± 2.4 nm), a high homogeneity (polydispersity index 0.181 ± 0.016) and a high fisetin encapsulation (58%). Liposomal fisetin retained the cytotoxicity and typical morphological effect of free fisetin in different tumour and endothelial cell lines. This liposomal formulation allowed to markedly increase the bioavailability of fisetin after *i.p.* administration. In addition, low dose of liposomal fisetin (21 mg/kg) improved fisetin antitumoral activity in LLC tumor bearing mice compared to the administration of free fisetin. This liposomal formulation could therefore advantageously be employed to improve the antiangiogenic and anticancer activities of this flavonoid, as well as other flavonoids sharing similar problems of *in vivo* administration because of their inherent low water solubility.