HAL
open science

Approches mathématiques multi-niveaux pour l'étude de la croissance des tumeurs : Application à la morphogenèse du cancer du sein et ciblage thérapeutique de l'angiogenèse du cancer du côlon

Floriane Lignet

To cite this version:

Floriane Lignet. Approches mathématiques multi-niveaux pour l'étude de la croissance des tumeurs : Application à la morphogenèse du cancer du sein et ciblage thérapeutique de l'angiogenèse du cancer du côlon. Mathématiques générales [math.GM]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2012. Français. NNT : 2012ENSL0771 . tel-00844807

HAL Id: tel-00844807

https://theses.hal.science/tel-00844807v1

Submitted on 16 Jul 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.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon - Université de Lyon

Discipline : **Mathématiques Appliquées**

Laboratoire : **Unité de Mathématiques Pures et Appliquées**
École Doctorale : **InfoMaths**

présentée et soutenue publiquement le 30 Novembre 2012
par Mlle **Floriane LIGNET**

Approches mathématiques multi-niveaux pour l'étude de la croissance des tumeurs.

Application à la morphogenèse du cancer du sein et au ciblage thérapeutique de l'angiogenèse du cancer du côlon

---

Directeur de thèse : **Emmanuel GRENIER**
Co-encadrant : **Benjamin RIBBA**

Après l'avis de Mark CHAPLAIN et Paolo MAGNI

Devant la commission d'examen formée de :

Mostafa ADIMY	Directeur de Recherche, Université de Lyon	Examinateur
Mark CHAPLAIN	Professeur, Université de Dundee, Ecosse	Rapporteur
Emmanuel GRENIER	Professeur, ENS de Lyon	Directeur
Paolo MAGNI	Professeur, Université de Pavie, Italie	Rapporteur
Roeland MERKS	Directeur de Recherche, CWI, Pays-Bas	Examinateur
Michel TOD	Professeur, P.H., Université de Lyon	Examinateur

Thèse préparée au sein de :

l'Université de Lyon,
Unité de Mathématiques Pures et Appliquées
CNRS UMR 5669, École Normale Supérieure de Lyon
46, allée d'Italie, 69364 LYON CEDEX 7, France

l'Equipe Projet Inria NUMED,
Inria Grenoble - Rhône-Alpes
Inovallée - 655, avenue de l'Europe
Montbonnot 38334 Saint Ismier, France

Centrum Wiskunde & Informatika
Science Park 123
1098 XG Amsterdam, Pays-Bas

Résumé

Les cancers sont l'une des causes majeures de mortalité dans le monde. Les mécanismes en jeu dans la croissance tumorale sont qualitativement connus, mais nous ne savons pas à l'heure actuelle prédire de manière précise quel sera le développement d'une tumeur donnée, ni estimer de façon certaine quel est le protocole thérapeutique optimal pour chaque patient. Il est entendu que la modélisation mathématique pourrait apporter des éléments de réponse à ces questions. C'est pourquoi durant cette thèse nous nous sommes intéressés à la construction de formalismes mathématiques pour décrire la croissance tumorale et l'action des traitements anti-cancéreux. En particulier, nous nous sommes intéressés à la prise en compte des mécanismes aussi bien moléculaires que cellulaires et tissulaires, par la construction d'un modèle continu, multi-échelles, de croissance de tumeur solide et d'angiogenèse. A partir de ce modèle, nous avons pu reproduire l'effet de traitements anti-angiogéniques sur le développement de tumeurs et envisager de façon qualitative un protocole optimal de combinaison entre un anti-angiogénique et une chimiothérapie.

Le modèle multi-échelles inclut une représentation mathématique des voies de signalisation du VEGF (*vascular endothelial growth factor* ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) dont nous détaillons la construction, basée uniquement sur les informations disponibles dans la littérature et les bases de données dédiées.

Dans une autre approche, nous avons considéré un modèle discret, cellule-centré, pour reproduire le développement de structures sphériques de cellules épithéliales mammaires telles qu'observées lorsque ces cellules sont cultivées *in vitro* dans un milieu approprié. Nous avons pu mettre en évidence les différents mécanismes cellulaires impliqués dans la morphogenèse de structures composées de cellules saines, et celles composées de cellules mutées.

Ces contributions montrent l'intérêt du formalisme multi-échelles adopté pour intégrer les connaissances et données sous-jacentes à l'étude du traitement des tumeurs. Nous discutons, à la fin de ce document, des problèmes méthodologiques posés par l'utilisation de ces approches. Ces problèmes constituent des verrous qu'il faudra lever pour faire de ces méthodes les nouveaux standards de modélisation en cancérologie.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death in Europe. The mechanisms involved in tumour growth are qualitatively known, but we are still unable to precisely predict how a given tumour will evolve, nor estimate with certainty the optimal therapeutic protocol for each patient.

It is well understood that mathematical modelling could give part of the answer to these questions. That is why during this thesis we considered the building of mathematical formalisms to describe tumour growth and the action of anti-cancer treatments. In particular, we investigated the molecular to tissular mechanisms of cancer development and angiogenesis through the building of a continuous multi-scale model. We were able to reproduce the effect of anti-angiogenesis treatments on tumour growth, and qualitatively study an optimal therapeutic protocol of anti-angiogenic combined with cytotoxic drugs. This multi-scale model integrates a mathematical representation of the signalling pathways of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). We detail the development of this model which is based solely on information available in the literature and dedicated databases. In another approach, we considered a discrete, cell-based model to reproduce the development of spheroid structures of mammary epithelial cells. This model considers the behaviour of these cells when observed while grown in vitro in an appropriate medium. We were able to highlight the different mechanisms involved in the morphogenesis of wild and mutated cells structures.

This work shows the importance of the multi-scale formalism we used to integrate the knowledge and data related to the study of cancer treatment. At the end of this document, we discuss the methodological issues raised by the use of such approaches. These issues are matters to be settled in order to make these models the new standards in cancer modelling.

Mots-clés : mathématiques appliquées, simulation numérique, estimation de paramètres, cancer, croissance tumorale, angiogenèse, tumeur mammaire, tumeur colorectale, optimisation thérapeutique, anti-angiogéniques, chimiothérapies.

Key-words : Applied mathematics, numerical simulation, parameter estimation, cancer, tumour growth, angiogenesis, mammary cancer, colo-rectal cancer, therapeutic optimization, anti-angiogenic drugs, chemotherapies.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier ceux qui m'ont encadrée durant ces trois années de thèse, à savoir Benjamin Ribba, qui m'avait accueillie en stage de master à Lyon Sud, où j'ai fait mes premiers pas en modélisation en pharmacologie. Benjamin a su me donner envie de poursuivre ces travaux en thèse en apportant des sujets d'étude et des partenariats stimulants, et m'a soutenue jusqu'à la fin ; Emmanuel Grenier, pour son accueil à l'UMPA et son aide précieuse pour la résolution de certains soucis mathématiques ; et Roeland Merks pour son accueil chaleureux à Amsterdam pendant six mois, son extraordinaire encadrement et son enthousiasme constant.

Je remercie chaleureusement Mark Chaplain et Paolo Magni, qui ont accepté la lourde tâche de lire et de juger l'intégralité des travaux présentés ici.

Par un ailleurs, un grand merci aux membres de mon jury, Michel Tod dont l'expertise en pharmacologie clinique permet d'apporter un éclairage particulier sur l'intérêt de mes travaux et Mostafa Adimy, pour son analyse critique de bio-mathématicien,

Une grande partie de mes travaux n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide d'Olivier Saut et de Thierry Colin, et surtout de mon co-projet de CEMRACS, Sébastien Benzekry, je leur suis profondément reconnaissante. Merci aussi aux membres de l'équipe Numed pour leurs conseils avisés sur mes travaux, et en particulier Vincent Calvez.

Je remercie Anna Emde et l'équipe du département de régulation biologique de l'Institut Weizmann, Israël, pour avoir eu l'amabilité de nous fournir les données expérimentales sans lesquelles une grande partie de mes travaux serait restée théorique.

Merci à Magalie et Virginia, du secrétariat de l'Umpa, pour leur gentillesse et leur aide incomparable pour survivre dans le dédale administratif de l'ENS. Merci à Sylvie Boyer pour la gestion de mes si nombreuses missions à l'étranger. Je garderais un agréable souvenir des doctorants de l'UMPA, et de l'immense perplexité dans laquelle me plongeaient toutes leurs discussions mathématico-mathématiques du déjeuner. Un merci tout particulier pour Séverine, qui a grandement facilité mon intégration dans l'équipe et a été une excellente co-bureau.

Je remercie par ailleurs toute l'équipe du CWI pour m'avoir permis de découvrir une autre approche de la recherche, tous les étudiants pour leur accueil chaleureux, mes co-bureaux locaux András et René, pour leur patience et leur disponibilité, Margriet pour ses conseils précieux, Sonia pour son éternelle

bonne humeur, et tous les autres...

Une pensée pour la nouvelle équipe grenobloise, je suis terriblement déçue de partir alors qu'elle se met tout juste en place, je leur souhaite une très bonne continuation.

Merci à l'équipe de mon premier labo d'accueil, je n'aurais peut-être pas continué si vous n'aviez pas contribué à la réussite de cette première expérience. En particulier Alexandre, Emilie, Ludivine, David... J'espère vous recroiser régulièrement en conférences ! Je pense d'ailleurs à tous les autres étudiants rencontrés lors de ces congrès scientifiques, avec qui j'ai pu partager des expériences improbables.

Je remercie particulièrement l'équipe enseignante de la filière Bim de l'INSA, pour m'avoir laissé la chance de continuer malgré des débuts on ne peut plus chaotiques, j'espère leur prouver qu'ils ont pris la bonne décision.

Enfin et surtout je veux remercier très chaleureusement tous ceux qui m'ont entourée durant toutes ces années : Marie, Hanane, Charlotte D., Sabine, Cath, Damien, Loïc, Gaël, Nico, Andy, Maxou, Gilles, Bastien, Ben, Raphie, et tous les autres que j'oublie, à bientôt pour une soirée viande !

Merci particulièrement à Florie et Charlotte M.B. pour leur relecture minutieuse de mon manuscrit.

Et bien sûr je remercie mes parents et mes soeurs pour leur soutien inconditionnel.

Table des matières

1 Introduction **6**
1.1 Notions d'épidémiologie du cancer 7
1.2 Considérations biologiques des tumeurs cancéreuses 8
1.3 Considérations thérapeutiques et pharmacologiques 15
1.4 Intérêt de la modélisation en cancérologie 20
1.5 Problématique, hypothèses et objectifs du travail 23

2 État de l'art **28**
2.1 Les premiers modèles en cancérologie 29
2.2 Les modèles pour données précliniques 30
2.3 Les modèles pour données cliniques 32
2.4 Les modèles mécanistiques 36

3 Modèle continu, multi-niveaux de croissance de tumeur solide et d'angiogénèse **40**
3.1 Avant-propos 40
3.2 Article : Analysis of the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy with a tumour growth inhibition multiscale model 45

4 Modèle continu des voies de signalisation moléculaire du VEGF, approche biologie systémique **76**
4.1 Avant-propos 76
4.2 Article : A structural model of the VEGF signalling pathway : emergence of robustness and redundancy properties 78

5 Modèle discret de formation de sphéroïdes de cellules mammaires humaines in vitro **98**
5.1 Avant-propos 98
5.2 Article : A computational model of HER2 over-expressing mammary epithelial cells spheroid formation in vitro 105

6 Discussion **127**

Liste des Figures **130**

Bibliographie **131**

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1 Notions d'épidémiologie du cancer 7

1.2 Considérations biologiques des tumeurs cancéreuses 8

1.2.1 Les caractéristiques des cellules cancéreuses 8

1.2.2 Les différentes phases de la croissance tumorale . . . 12

1.3 Considérations thérapeutiques et pharmacologiques 15

1.4 Intérêt de la modélisation en cancérologie 20

1.5 Problématique, hypothèses et objectifs du travail 23

1.5.1 Problématique 23

1.5.2 Hypothèses du travail 24

1.5.3 Objectif 26

1.1 Notions d'épidémiologie du cancer

Dans ce court chapitre, nous donnons des éléments d'épidémiologie des pathologies auxquelles nous nous intéressons dans ce travail : les cancers. Ces données proviennent de l'agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie et du site GLOBOCAN 2008 [1] du centre international de recherche sur le cancer.

En France, entre 2004 et 2008, les cancers ont été la première cause de décès chez l'homme (32.9% de l'ensemble des décès masculins) et la seconde chez la femme (23,4% de l'ensemble des décès féminins). Chez l'homme, c'est le cancer du poumon qui est à l'origine du plus grand nombre de décès. Chez la femme, il s'agit du cancer du sein. Les taux d'incidence et de mortalité relevés en France sont proches de ceux observés dans toute l'Europe, au Canada et aux Etats-Unis d'Amérique. En 2011, il y a eu en France environ 365500 nouveaux cas (207000 hommes et 158500 femmes) ; et environ 84500 hommes et 63000 femmes décèderaient d'un cancer chaque année. Enfin, si à l'heure actuelle l'écart de la mortalité par cancer entre les hommes et les femmes se réduit au cours du temps, le taux de mortalité reste deux fois supérieur chez l'homme. Il est par ailleurs intéressant de noter que le cancer, considéré longtemps comme une maladie des pays riches, connaît une incidence grandissante dans les pays sous-développés ou en voie de développement. Le taux de mortalité dû aux cancers pourrait y être ces prochaines années 5 fois supérieur à celui des pays riches, et ce à cause de nombreux facteurs dont l'accès aux soins et aux innovations thérapeutiques, mais aussi la prévention, les soins palliatifs et la prise en charge de la douleur.

Table 1.1 – Taux d'incidence et de mortalité des cancers (toutes formes confondues) rapportés à 100000 hommes et femmes

	Taux d'incidence /100000	Taux de mortalité /100000
Homme	382.7	138.6
Femme	268.5	77.6

Le mot "cancer" est attribué à un grand nombre de maladies en réalité très différentes avec des manifestations variées et impliquant des soins et traitements différents. De même, le pronostic vital est également différent d'un cancer à un autre. Nous présenterons ainsi des données d'épidémiologie des deux cancers qui nous intéressent plus particulièrement dans ce travail : le

1. http ://globocan.iarc.fr

cancer du sein et le cancer colorectal. En France en 2011, il y a eu 53000 nouveaux cas de cancer du sein avec un âge moyen au diagnostic de 61 ans. Le nombre de décès s'élèvait à 11500. Les taux d'incidence et de mortalité pour l'année 2011 étaient respectivement 99,7 et 16,0 pour 100000 femmes. Concernant le cancer colorectal, 40500 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2011 (21500 hommes et 19000 femmes) ; et 17500 décès recensés. L'incidence est de 36,3 pour 100000 hommes et 24.7 pour 100000 femmes. La mortalité de 13,8 pour 100000 hommes et 8,2 pour 100000 femmes.

1.2 Considérations biologiques des tumeurs cancéreuses

1.2.1 Les caractéristiques des cellules cancéreuses selon D. Hanahan et R.A. Weinberg

On catégorise généralement les cancers en fonction du type de cellules dont ils émergent. On peut ainsi distinguer :

- les carcinomes, formés à partir de cellules constituant l'épithélium,
- les sarcomes, à partir de cellules de tissus conjonctifs
- les cancers hématopoïétiques, qui touchent les cellules sanguines.

Notre travail portera uniquement sur des carcinomes, en particulier le cancer du sein, issu des cellules épithéliales constituant les canaux lactifères, et le cancer colorectal qui émerge à partir des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. Ainsi tous les mécanismes biologiques décrits ci-après, ainsi que les modèles mathématiques développés ne concernent que le développement de tumeurs solides.

Dans cette partie, nous souhaitons présenter des considérations générales sur la biologie des tumeurs, pour ce faire, nous nous sommes basés sur les travaux de Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg qui décrivirent dans une première version en 2000 puis en 2011 dans la revue Cell (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011), les principales caractéristiques des cellules cancéreuses. Un cancer, ou tumeur maligne, est un amas de cellules qui ont subi des mutations génétiques modifiant leur comportement. Ainsi, selon les auteurs, il y a 7 caractéristiques déterminantes qui différencient les cellules cancéreuses des cellules saines (voir figure 1.1) : l'évasion aux mécanismes d'apoptose, l'autostimulation de signaux de croissance, l'invasion des tissus et la formation de métastases, le potentiel de réplication infini, l'échappement à la surveillance et à l'action du système immunitaire, l'insensibilité aux signaux d'anti-croissance

et enfin l'induction du processus d'angiogénèse ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur.

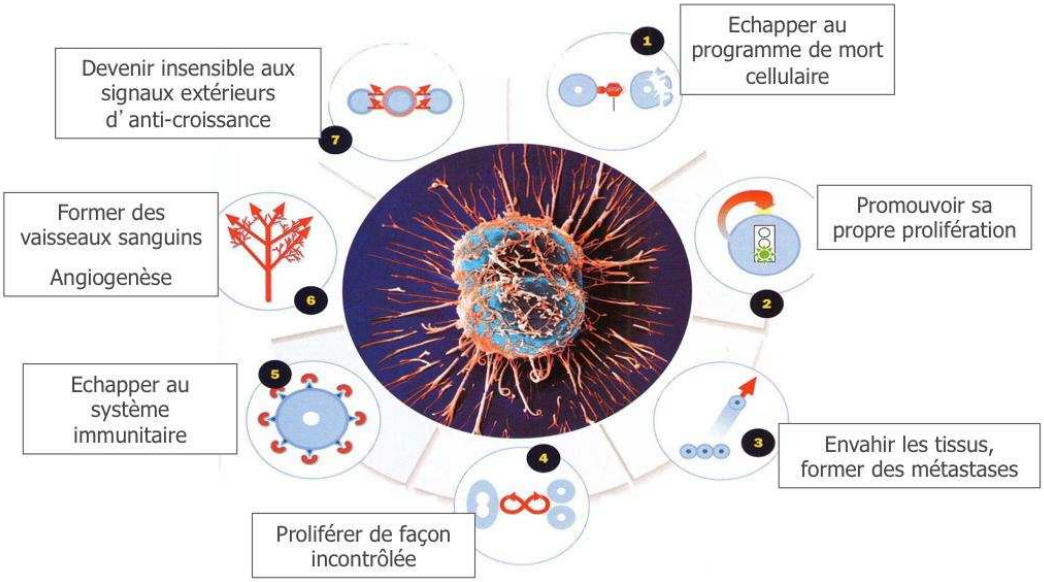

FIGURE 1.1 – Les 7 caractéristiques d'une cellule cancéreuse, en comparaison à une cellule saine. Source : Future, Aventis 2003, A. Puisieux, CLB, Lyon. Représentation inspirée de l'article de Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg publié dans la revue Cell en 2000.

L'évasion aux mécanismes d'apoptose : Dans la plupart des cancers, les cellules deviennent insensibles aux signaux d'apoptose ou de mort cellulaire, qui permettent normalement de réguler leur prolifération et qui empêchent la réplication de cellules génétiquement altérées, et donc le développement de tumeurs. Cela entraîne un mécanisme d'emballement qui donne lieu à la réplication de cellules dont le matériel génétique devient de plus en plus altéré. Une des mutations les plus classiques est l'inactivation du gène codant la protéine p53, un suppresseur de tumeur qui arrête le cycle cellulaire et peut déclencher la mort cellulaire.

L'auto-stimulation de signaux de croissance : une des modifications les plus importantes est l'autosuffisance en signaux de prolifération. Celle-ci se met en place de diverses façons : les cellules vont sécréter des facteurs de croissance qui stimulent les cellules voisines, on parle alors de stimulation paracrine, ou bien répondre aux signaux qu'elles produisent elles-mêmes, il s'agit

ici de stimulation autocrine. De plus, les cellules peuvent stimuler des composants de la matrice extracelullaire tels que les fibroblastes qui vont sécréter en retour des facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses peuvent aussi voir leur quantité de récepteurs membranaires augmenter, ce qui accroît la réponse à la quantité normale de ligand. Par ailleurs, l'augmentation de la prolifération peut être due à des modifications des voies de signalisation intracellulaires qui peuvent s'activer en absence de liaison du récepteur à son ligand. Enfin, les boucles de rétroaction censées atténuer la réponse cellulaire aux signaux proliferatifs peuvent être inactivées.

L'invasion des tissus et la formation de métastases : L'envahissement ou l'invasion des tissus conjonctifs en périphérie des tumeurs solides est à l'origine de la formation des métastases (mécanisme qui requiert d'autres processus tels que l'angiogénèse, détaillée plus loin). A l'origine de ce processus, plusieurs classes de protéines impliquées dans la liaison des cellules à leur tissu environnant sont modifiées. Ces protéines sont principalement les cadhérines et les intégrines. En plus des signaux favorables à la croissance qui pourraient résulter de cette aberration, elle conduit aussi à la sécrétion des enzymes de protéolyse ou de métalloprotéinases (MMP) qui dégradent la matrice extracellulaire. Les cellules peuvent alors migrer dans le tissu conjonctif.

Le potentiel de réplication infini : Dans les tissus sains, le nombre de divisions cellulaires est limité par l'érosion des télomères, parties terminales des chromosomes. Une cellule ayant des télomères trop érodés entre irréversiblement en sénescence, un état stable mais non proliferatif. Dans de nombreuses souches cancéreuses, on observe une surproduction de télomèrases, protéines qui recontruisent les télomères endommagés. Ainsi, il n'y a plus de système de décompte des divisions cellulaires, permettant à la cellule une reproduction potentiellement infinie. Un petit nombre de cellules mutées est donc suffisant pour voir apparaître une lésion tumorale, par accumulation successive de dégradations du matériel génétique au cours de l'expansion clonale.

L'échappement à la surveillance et à l'action du système immunitaire : Notre organisme est doté de mécanismes immunitaires de surveillance et de contrôle de toutes anomalies cellulaires. En effet, il est possible qu'un grand nombre de lésions tumorales restent à un stade bénin, la surveillance immunitaires les empêchant d'acquérir plus de mutations et de devenir invasives. Les tumeurs malignes ne sont plus sensibles à ce contrôle.

L'insensibilité aux signaux d'anti-croissance : La progression dans le cycle cellulaire (série de processus qui permettent à une cellule d'accroître son volume, de répliquer son matériel génétique et procéder à la mitose donnant lieu à la division en deux cellules indépendantes) est normalement régulée négativement par un ensemble de mécanismes moléculaires. En particulier des protéines peuvent arrêter le cycle cellulaire si des erreurs de réplication génétique sont repérées. Dans de nombreuses souches cancéreuses, ces protéines sont inactives ou fortement inhibées. C'est le cas par exemple des complexes Cyclin-CDKs.

L'induction du processus d'angiogénèse : Afin de pouvoir grossir librement, la tumeur doit établir son propre réseau vasculaire. Des mutations génétiques permettent aux cellules de sécréter, en cas de stress hypoxique, des facteurs angiogéniques qui vont entrer en compétition avec les facteurs anti-angiogéniques naturellement présents dans l'organisme pour prévenir une croissance anarchique de la vasculature (Folkman, 2006). On assiste alors à ce qu'on appelle le "switch" angiogénique, la quantité de facteurs pro-angiogénèse dépassant celle des facteurs l'inhibant (Hanahan and Folkman, 1996). De nombreuses molécules angiogéniques chemo-attractantes peuvent être sécrétées par les cellules tumorales, entre autres, l'EGF (*epidermal growth factor* ou facteur de croissance épidermique), le FGF (*fibroblast growth factors* ou facteur de croissance des fibroblastes) et le plus fréquemment cité, le VEGF (*vascular endothelial growth factor* ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Ces molécules sont contrebalancées par les angiopoïétines, la thrombospondine ou l'endostatine, sécrétées par les tissus sains (Ferrara, 2002). En réponse aux signaux angiogéniques qui diffusent dans les tissus autour de la tumeur, créant un gradient de concentration chimique, les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins proches de la tumeur sont activées. On assiste à une dégradation des adhésions moléculaires entre les cellules endothéliales elles-mêmes et entre cellules endothéliales et péricytes entourant les vaisseaux sanguins. Cette déstabilisation induit la sécrétion de MMPs (*matrix metallo-proteases* ou métalloprotéases matricielles), enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire pour y faciliter la migration des cellules. La prolifération des cellules endothéliales s'accélère, et elles migrent suivant le gradient de signaux angiogéniques, suivant un mécanisme dit de chemotaxie, ou chimiotactisme. Elles s'organisent alors pour former des structures tubulaires, les néo-vaisseaux. Via la sécrétion de FGF, la tumeur recrute des fibroblastes qui vont se différencier en péricytes et cellules musculaires lisses autour des néo-vaisseaux, ce qui permet la maturation et la stabilisation des cellules endothéliales. Cependant la maturation des vaisseaux créés par l'angiogénèse tumorale est incomplète, les

vaisseaux sont peu efficients, ayant une trop grande perméabilité (Jain, 1988, 2001). Néanmoins, les vaisseaux se développent jusqu'à atteindre la tumeur, créant alors une source d'oxygène et de nutriments favorisant la croissance de la tumeur (Bergers et al., 2003). La figure 1.2 représente schématiquement les processus de l'angiogénèse tumorale.

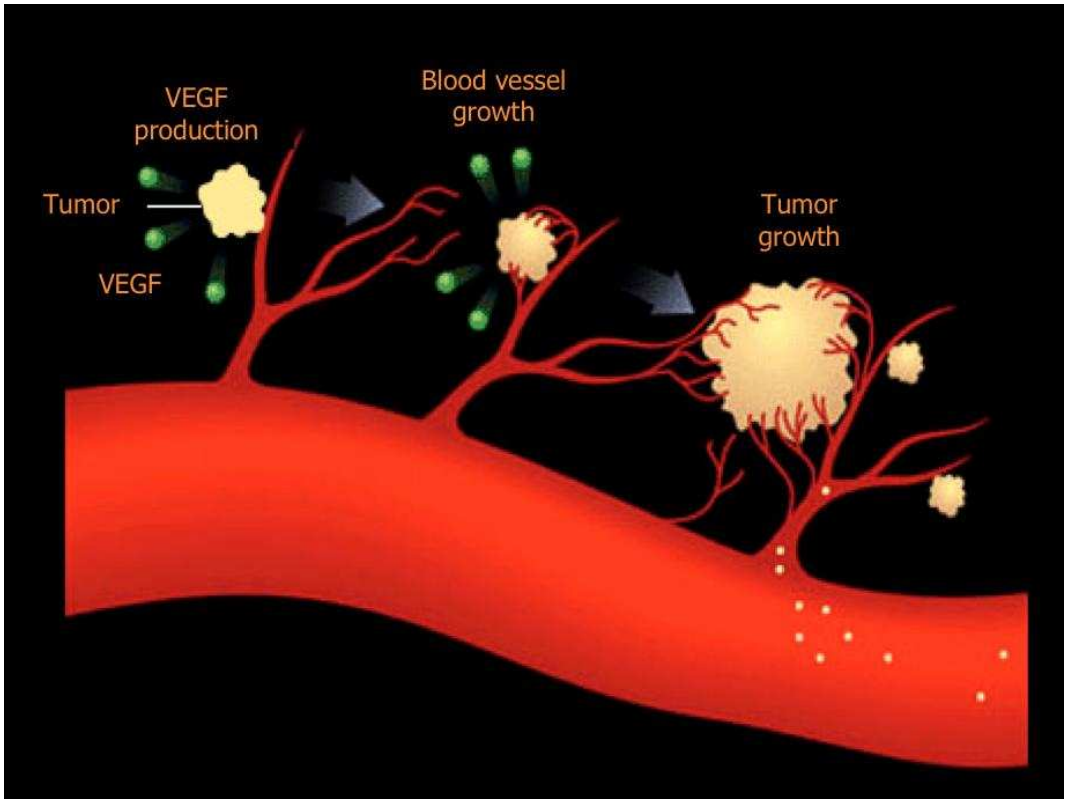

FIGURE 1.2 – Représentation schématique du processus d'angiogénèse tumorale. Source Genentech (www.gene.com). De gauche à droite : la tumeur avasculaire et hypoxique sécrète des facteurs de croissance (VEGF). Ces derniers vons se lier aux cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux sanguins et promouvoir leur prolifération et migration vers la tumeur. Il en résulte la formation d'un réseau sanguin intra-tumoral. On parle alors de tumeur vasculaire ou vascularisée.

1.2.2 Les différentes phases de la croissance tumorale

La phase avasculaire : Le développement d'un cancer solide débute par une phase appelée hyperplasie, le volume du tissu épithélial augmente suite à

une prolifération cellulaire accrue. Puis vient une phase de dysplasie : l'architecture du tissu se désorganise, la différenciation cellulaire diminue, des irrégularités apparaissent dans la taille des cellules et des noyaux, la polarité des cellules est disparate. Lorsque les cellules cancéreuses remplissent toute la hauteur de l'épithélium, mais sans traverser la membrane basale épithéliale, on parle de carcinome in situ, ou carcinome non invasif. On peut distinguer ces différents états tissulaires sur la figure 1.3 qui présente des images d'anatomo-pathologie et des vues schématiques des phases d'hyperplasie, dysplasie et invasion locale.

Dans les premières phases de développement, les tumeurs puisent les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur survie dans le milieu environnant, à partir des structures vasculaires et lymphatiques préexistantes, au détriment du tissu sain. La taille tumorale est alors limitée à quelques millimètres. En effet, du fait de leur fort taux de prolifération, les cellules épuisent les ressources en oxygène du milieu, n'en laissant pas suffisamment aux cellules situées plus profondément dans la masse. Les cellules au centre de la tumeur en viennent à souffrir d'hypoxie, et rentrent alors en phase quiescente, tandis que seules les cellules périphériques conservent un caractère proliératif. Les cellules en hypoxie entrent en nécrose si les conditions se dégradent trop fortement du fait de l'accroissement de la masse tumorale. La tumeur se structure alors en couches de cellules de phénotypes différents. La périphérie de la masse tumorale est constituée de cellules proliférantes, qui entourent une populations de cellules quiescentes, hypoxiques, elles-mêmes entourant un cœur nécrotique. On parle alors de structures sphéroïdes ou tumeurs avasculaires.

La phase vasculaire : Une fois reliée à son propre réseau vasculaire, la tumeur peut croître de façon exponentielle, recrutant de nouveaux vaisseaux à mesure que ses besoins en nutriments augmentent. Un cœur nécrosé subsiste néanmoins toujours, entouré d'un anneau de cellules quiescentes. En effet la qualité de la néo-vasculature étant mauvaise, l'oxygène ne peut diffuser sur quelques millimètres dans les tissus autour des vaisseaux. La présence d'un réseau vasculaire permet le détachement de cellules tumorales qui, profitant de la perméabilité des vaisseaux, vont entrer dans la circulation sanguine. Elles peuvent alors être déposées au niveau d'autres organes où elles s'établissent et forment des tumeurs secondaires appelées métastases. La formation des métastases se fait suivant plusieurs étapes. Les liaisons cadhérines liant les cellules tumorales entre elles se dissocient, permettant la migration de cellules dans la tumeur puis dans les tissus environnants dégradés auparavant par des MMPs. Les cellules libres peuvent alors entrer dans les capillaires sanguins ou lymphatiques (phénomène d'intravasation) et en ressortir (extravasation) au niveau

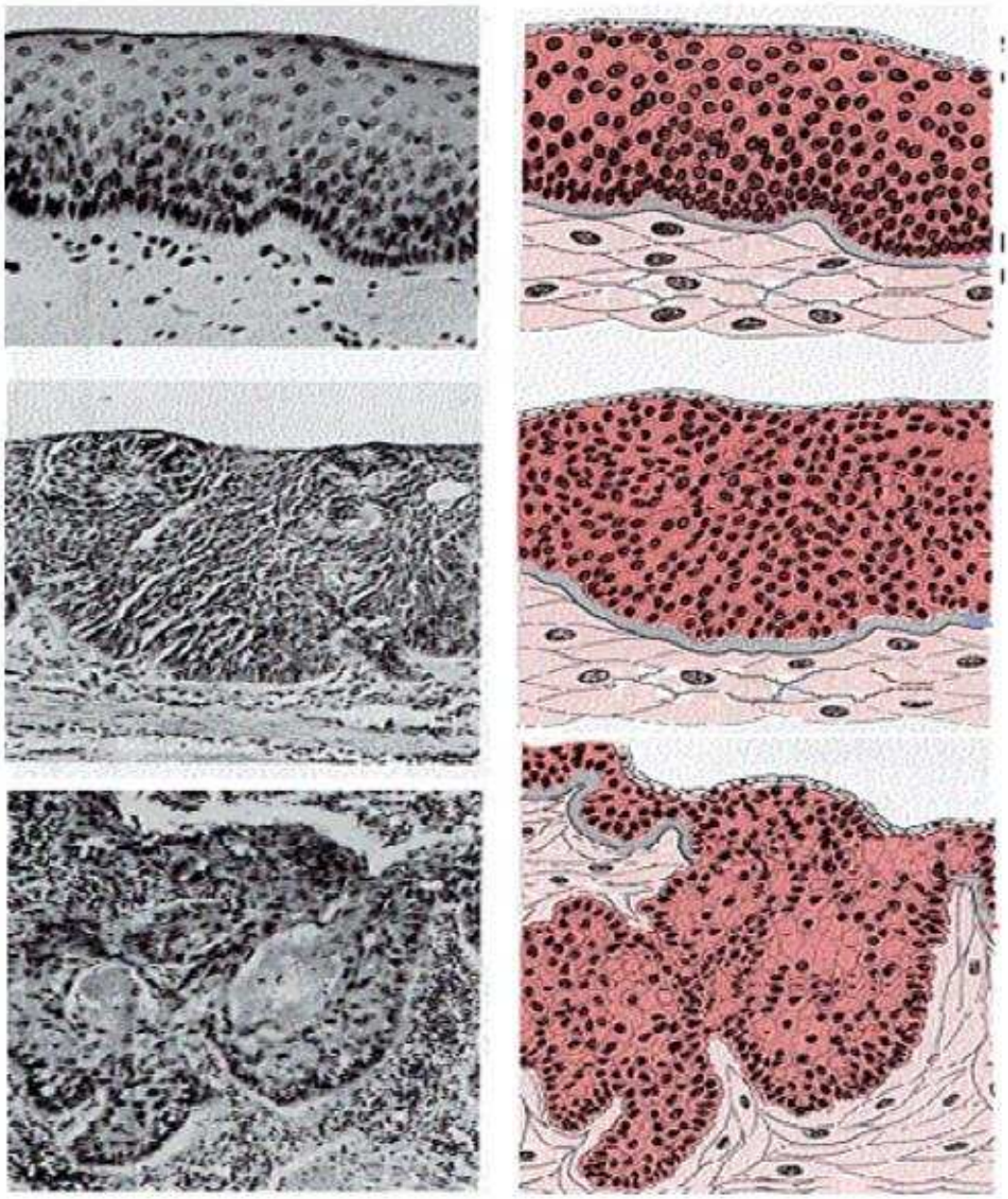

FIGURE 1.3 – Photos (gauche) et illustration (droite) des phases d'hyperplasie (haut), dysplasie (milieu) et invasion locale (bas). Source inconnue

d'un autre organe. Après une phase de dormance, la cellule entre en mitose, créant une micro-métastase avasculaire. La nouvelle tumeur croît ensuite suivant le même processus que la tumeur primaire, en établissant par angiogénèse son propre réseau vasculaire. Plus de détails sur ces mécanismes peuvent être trouvés dans Gupta and Massagué (2006) et Klein (2008). Par ailleurs, une illustration de la croissance tumorale est proposée dans la figure 1.4.

1.3 Considérations thérapeutiques et pharmacologiques

Selon un rapport réalisé par l'Institut National du Cancer (INCa) intitulé "Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France" datant de Novembre 2010, la mortalité due aux cancers a connu un recul important au cours des 20 dernières années. Cette évolution est principalement liée à l'amélioration des méthodes et stratégies à la fois de diagnostic et de prise en charge thérapeutique des patients. Concernant le diagnostic, la politique de santé publique, mise en place sous l'impulsion des deux Plans Cancer a amélioré le dépistage de certains cancers, comme le cancer du sein, du côlon-rectum, et du col de l'utérus. Le développement des centres anti-cancéreux a aussi contribué à une meilleure prise en charge des patients en majorant la dimension éthique et humaine via le développement des soins palliatifs, la prise en charge de la douleur, et le soutien psychologique. Enfin, les progrès thérapeutiques ont permis une très forte baisse du taux de mortalité dans certains cancers comme le cancer du testicule et de la thyroïde. Cette tendance est appelée à se confirmer grâce aussi aux progrès de la recherche en matière de thérapies anti-cancéreuses. Les années 2000 ont marqué l'arrivée des thérapies ciblées : molécules thérapeutiques capables de cibler les processus spécifiques du cancer. Même si leur contribution dans l'amélioration de la survie des patients reste modeste et loin des attentes, ces molécules ouvrent la voie de nouvelles voies thérapeutiques plus spécifiques et personnalisées que les chimiothérapies conventionnelles. L'idée de médecine personnalisée fédère ainsi de nombreux espoirs pour demain. Les gouvernements et l'industrie pharmaceutique ont mis en jeu des investissements importants dans la recherche génomique et protéomique pour l'identification des caractéristiques individuelles des patients et de leur maladie afin de trouver la façon optimale de traiter chacun.

Cependant, la réalité de l'état du développement du médicament contre le cancer dans l'industrie pharmaceutique est préoccupante. En effet, le développement de médicaments est un long processus qui se décompose en plusieurs

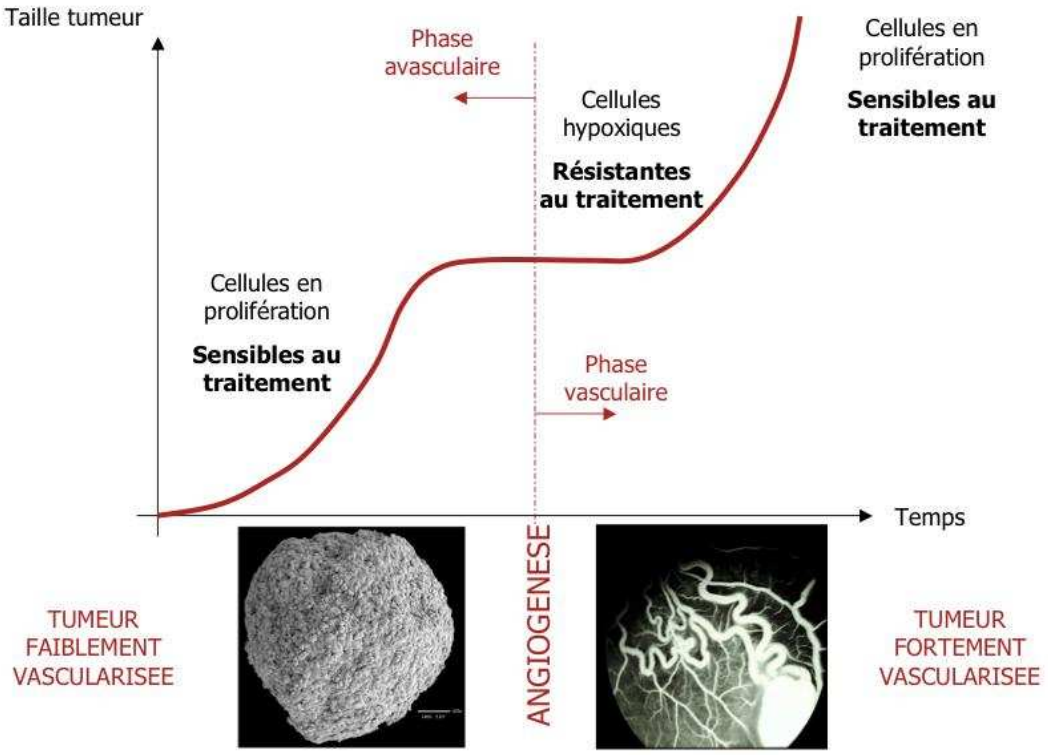

FIGURE 1.4 – Représentation schématique de l'évolution de la croissance tumorale avec les deux phases principales de croissance : avasculaire (sphéroïde) et vasculaire (tumeur vascularisée - la photo en bas à droite représente en réalité la rétine hyper-vascularisée d'un animal suite au processus d'angiogénèse. On représente également ici la conséquence théorique de ces deux phases sur la croissance tumorale. Attention, il s'agit ici d'une représentation schématique et conceptuelle. Même s'il semblerait que ce profil de courbe puisse être visualisé sur certaines données d'expériences chez la souris (communication personnelle I. Troconiz et voir présentation B. Ribba PAGE 2009) les courbes de volume tumoral publiées présentent en général un profil croissant et monotone.

phases de recherche. La première phase est appelée discovery. Tout commence par la recherche d'une cible, c'est à dire la molécule, la protéine, ou encore le processus sur lequel il convient d'agir pour créer une action thérapeutique. L'identification d'une cible provient de la recherche fondamentale en biologie qui analyse le processus pathologique pour en comprendre les dysfonctionnements et identifier ce sur quoi il convient d'agir. Lorsque la cible est identifiée, il faut rechercher une substance chimique qui va avoir une affinité et une action sur la cible. Cette étape est réalisée par criblage automatique en cherchant dans des librairies de composants chimiques. On estime qu'à ce stade, 5 à 7 millions de substances sont retenues comme potentiellement candidates. La succession de tests sur la conformation et la stabilité de ces substances permet de réduire la liste à quelques centaines de molécules pour lesquelles des tests d'efficacité et d'affinité sont entrepris. On parle alors de développement exploratoire. On passe ensuite à des étapes où les molécules identifiées sont soumises à des tests de laboratoire sur animaux afin de tester leur efficacité, leur tolérance et leur action sur la maladie. Cette phase est appelée le développement préclinique. Ces tests et leurs conclusions permettent de réduire drastiquement le nombre de molécules pour lesquelles il convient de poursuivre le développement dans la phase dite clinique. Cette étape comprend en général 3 phases : en phase I, le médicament est administré à un petit groupe de malades (ou sujets sains, cela dépend de l'aire thérapeutique). Le but est de contrôler la toxicité du médicament en recherchant la dose maximale tolérée (MTD). C'est cette dose qui servira de repère pour les étapes suivantes du développement ; dans la phase II, le médicament est administré à un groupe plus important de patients afin d'avoir une première indication de son efficacité tout en s'assurant qu'il soit toléré par les patients ; si cette phase réussit, la phase III, déterminante, est initiée. Elle implique des centaines de patients afin de démontrer statistiquement le bénéfice thérapeutique de la nouvelle molécule par rapport au traitement de référence.

On estime que le développement d'une molécule dure entre 15 et 20 ans pour un coût global qui a été estimé en 2005 à 38 milliards de dollars. Ce coût est en croissance exponentielle depuis les années 1980. En parallèle, le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché n'augmente pas, au contraire, il diminue depuis 1996 pour rejoindre le chiffre de 20 nouvelles molécules (uniquement) en 2005.

En ce qui concerne les traitements anti-cancéreux, les chiffres de la rentabilité au sens du rapport entre investissement et nombre de nouveaux traitements mis sur le marché, sont alarmants. On estime ainsi que le taux de réussite du développement thérapeutique est de 5%. C'est à dire que pour 100 molécules

pour lesquelles le développement est initié, seulement 5 seront finalement délivrées sur le marché. Plus grave encore, parmi les molécules pour lesquelles la dernière phase du développement (la phase III) est enclenchée, seulement 40% seront finalement délivrés sur le marché. L'industrie pharmaceutique et les agences de régulation du médicament comme la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis cherchent depuis plusieurs années à comprendre et analyser les raisons de ce faible rendement. Un des nombreux aspects de ce problème est le manque de continuum dans les décisions de passer d'une phase à l'autre du développement, sur la base des résultats d'efficience (processus dit du go - no go, qui permet d'arrêter de façon précoce le développement d'un médicament). On assiste en effet aujourd'hui dans l'industrie pharmaceutique à la prise de décisions sur la base des résultats de la seule dernière phase, perdant l'information acquise lors des phases précédentes. Concrètement, lorsque les tests en laboratoires sont satisfaisants, on lance des tests sur animaux sans intégrer les informations recueillies auparavant. Il en est de même lorsque l'on passe des tests précliniques aux étapes cliniques pour lesquelles un tout nouveau développement démarre. Il est d'ailleurs intéressant de noter le cloisonnement, dans une même entreprise, entre la recherche préclinique et la recherche clinique. Parfois même, la recherche préclinique est réalisée par des prestataires extérieurs, ce qui contribue à dissocier encore plus les deux phases. C'est dans ce contexte que l'industrie pharmaceutique et les agences de régulation ont récemment modifié leur position stratégique pour promouvoir le développement des activités de modélisation et de simulation afin d'intégrer l'information au cours du développement et créer ainsi un continuum entre les différentes étapes du développement. La plupart des grandes entreprises du médicament sont à présent dotées d'un département M&S (modeling and simulation) plus ou moins ample. A titre d'exemple, celui de Novartis est peut être le plus grand avec près de 80 personnes. Ces équipes fonctionnent de manière transversale par rapport aux différentes étapes du médicament et sont plutôt classées selon l'aire thérapeutique. On assiste alors à une réelle évolution dans laquelle la pathologie et ses mécanismes deviennent le socle stable sur lequel viennent se greffer différentes études dont le but est d'intégrer les résultats d'une étape à l'autre du développement d'une nouvelle molécule.

Le Critical Path Initiative [2] est une des actions de la FDA qui vise à améliorer l'efficience des produits développés et d'identifier et d'évaluer la priorité des problèmes les plus importants dans le développement du médicament. Dans cette action, il est question de "model-based drug development", c'est-à-dire l'utilisation de modèles pharmaco-statistiques d'efficacité et toxicité pour les

2. www.fda.gov//ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/

données précliniques et cliniques ; ceci afin d'améliorer le développement thérapeutique et en particulier le processus de décision go - no go. D'autres initiatives similaires sont actuellement mises en place par différentes institutions et entreprises du médicament. La figure 1.5 présente de façon schématique le rôle de M&S dans les différentes étapes décisionnelles d'une phase à l'autre du développement thérapeutique.

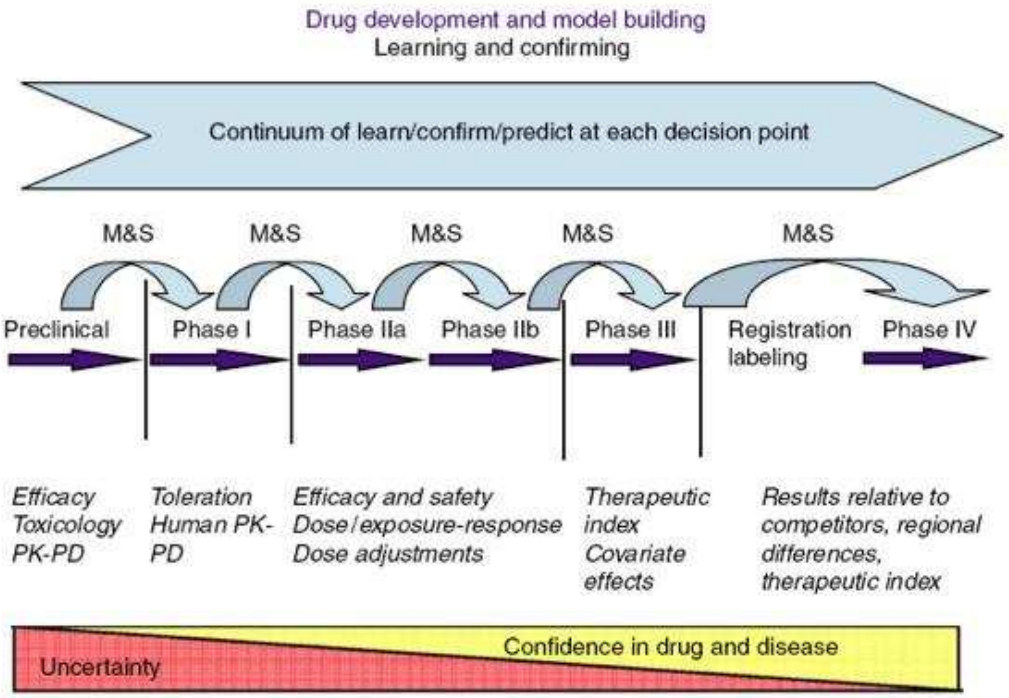

FIGURE 1.5 – Rôle pressenti des activités de modélisation et simulation (M&S) dans le développement du médicament, comme un outil d'aide à la décision d'un stade à l'autre. Le processus est alors un processus continu où l'information d'une nouvelle étape vient s'ajouter aux informations de l'étape précédente et est analysée grâce aux modèles. Source : Lalonde et al. Model-based drug development. Clinical Pharmacology and Therapeutics 2007.

Dans un article publié en 2008 dans la revue American Association of Pharmaceutical Scientists Journal (AAPS J) , Liping Zhang propose des propriétés pour les modèles à développer : ces modèles doivent être mécanistiques (et pas seulement statistiques), intégrer différentes sources de connaissances et de données, et être validés sur la base de leur potentiel de prédictibilité (Zhang et al., 2008). Ces modèles peuvent alors constituer des instruments d'aide à la

décision, en étant développés de façon prospective durant le développement et en constituant un formalisme continu d'intégration des connaissances tout au long du développement thérapeutique. En pratique, cette approche peut permettre de mieux quantifier l'analyse des données d'efficience des traitements. Leur mise en place peut également permettre de changer les mentalités sur la façon de relever les données d'efficience des traitements. Nous allons voir par la suite, l'impact de cette initiative dans deux exemples concrets en cancérologie.

1.4 Intérêt de la modélisation en cancérologie

Les traitements cytotoxiques, en particulier les chimiothérapies, ont pour effet indésirable la myelosuppression, qui est l'appauvrissement de la moelle osseuse en cellules progénitrices de cellules sanguines telles que les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes). Le déficit en leucocytes, ou neutropénie, induit une augmentation du risque d'infections et de leur gravité. Elle est classiquement évaluée par le "nadir", qui est la valeur la plus basse du compte de neutrophiles ou de leucocytes après le traitement, pour décider d'un éventuel ajustement du protocole thérapeutique. Or une telle mesure ne rend pas compte de la durée de la neutropénie, et occulte la variation dans le temps des variables hématologiques. L'équipe de Léna Friberg à l'Université d'Uppsala a développé en 2002 un modèle mécanistique de l'évolution de la neutropénie à partir de paramètres mesurables en clinique. Pour cela, les comptes de neutrophiles et de leucocytes, ainsi que les concentrations sanguines de cytotoxiques ont été mesurés chez des patients traités par chimiothérapie suivant différents protocoles. Un modèle à plusieurs compartiments a pu être établi, dont les paramètres ont été estimés par une analyse non linéaire à effets mixtes, et qui permet de prédire de façon juste l'évolution des quantités de neutrophiles et de leucocytes à partir des quelques mesures biologiques relevées (Friberg et al., 2002). Les aspects intéressants de ce modèle sont (i) sa validité en terme de prédiction de la toxicité chez un sujet, (ii) la translation de la prédiction depuis l'animal à l'homme et (iii) son applicabilité pour des problèmes majeurs du développement d'essais cliniques comme par exemple le design optimal d'études cliniques. Depuis, la mesure du simple nadir est devenue quasiment obsolète et les équipes cliniques sont à présent invitées à relever de façon continue les données hématologiques par prélèvements sanguins répétés dans le temps.

Dans le domaine de l'efficacité des médicaments anti-cancéreux, on utilise également un critère "statique" d'évaluation appelé RECIST pour Response Evaluation Criteria for Solid Tumors. RECIST permet de classifier la réponse au traitement en se basant sur le calcul de la variation de la taille tumorale

mesurée avant traitement, puis à une date fixée après la fin de celui-ci (Miller et al., 1981; Therasse et al., 2000). Comme l'illustre la figure 1.6, l'information dynamique de l'évolution de la taille tumorale est essentielle pour évaluer la réponse au traitement.

Ces dernières années, des modèles ont permis de suggérer le remplacement de ce critère par une mesure continue (on parle aussi de mesures longitudinales) de la taille tumorale. Ainsi, en se basant sur une approche compartimentale, l'équipe de M. Simeoni a proposé en 2004 un formalisme de modélisation continu de l'évolution de la taille tumorale de souris sous traitement (Simeoni et al., 2004). La validité et la robustesse de ce formalisme ont été testées dans différentes études publiées et ce modèle fait office de référence dans l'industrie pharmaceutique pour l'analyse de données précliniques. Dans le cadre de données cliniques, des contributions récentes proposent de nouvelles approches pour l'analyse des données longitudinales. Il convient ici de faire référence en particulier à l'article de Laurent Claret et René Bruno, publié dans le Journal of Clinical Oncology en 2009 (Claret et al., 2009). Ce travail s'ancre dans la problématique de transition d'une phase à l'autre du développement thérapeutique via le processus décisionnel go-no go. En cancérologie, on observe souvent des molécules pour lesquelles les essais de phase I et II sont jugés satisfaisants mais dont le développement s'arrête lors de la phase III pour manque d'efficience. La question sous-jacente aux travaux de Laurent Claret et René Bruno est la suivante : peut-on utiliser des informations précoces de l'efficacité du traitement, comme la dynamique de la taille tumorale en phase II, pour prédire l'efficacité à long terme telle que la survie, et ainsi décider de la pertinence d'une phase III ? Grâce à des données de taille tumorale de cancer colorectal chez 34 patients traités par Capécitabine lors d'une phase II et 301 patients traités par 5-fluorouracile lors d'une phase III, les auteurs démontrent la possibilité de cette approche et réussissent à prédire les résultats, en terme de survie globale, d'une phase III associant le 5-fluorouracile et la Capécitabine.

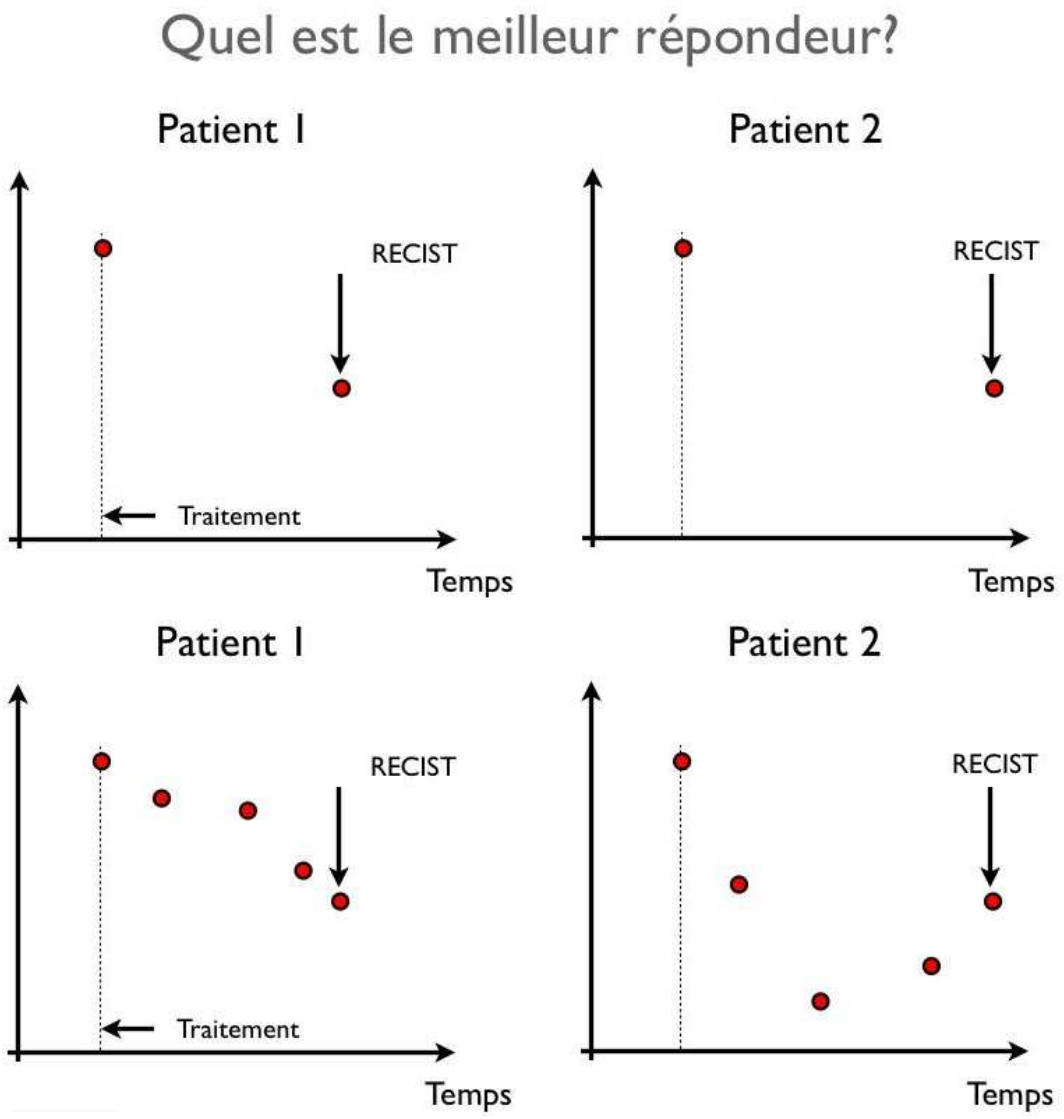

FIGURE 1.6 – Illustration schématique de l'importance de l'information dynamique de l'évolution de la taille tumorale pour évaluer l'efficacité d'un traitement. En haut, deux patients qui ont la même mesure du critère RECIST. En bas, l'information dynamique de l'évolution de la taille tumorale de ces deux patients. Malgré la réduction plus importante de la taille tumorale chez le patient 2, sa tumeur recroit alors qu'elle continue de décroitre chez le patient 1. Sans toutefois pouvoir dire quel est le meilleur répondeur, on ne peut douter de l'importance de ces informations pour évaluer la réponse au traitement.

1.5 Problématique, hypothèses et objectifs du travail

1.5.1 Problématique

La modélisation et la simulation sont en train d'émerger comme disciplines adéquates pour l'analyse de données longitudinales d'efficience de médicaments, et ce afin d'améliorer la prise de décision lors du développement thérapeutique. D'un point de vue plus technique, les modèles généralement développés, notamment ceux présentés plus haut, sont essentiellement empiriques. Même si cet empirisme est raisonné et adapté aux données analysées dans ces études, garantissant ainsi le principe de parcimonie, on doit souligner l'écart évident entre la complexité biologique de la maladie cancéreuse et la simplicité des modèles utilisés. Certes, cette simplicité fait l'intérêt principal de l'approche et il n'est pas dit que l'ajout de complexité mathématique dans ces modèles puisse générer des outils d'analyse plus pertinents. Un exemple notoire est la modélisation compartimentale en pharmacocinétique qui permet de décrire la concentration plasmatique résultant de l'administration (par différentes voies) d'une grande variété de médicaments par des modèles compartimentaux traduits en systèmes d'équations différentielles ordinaires où les échanges entre compartiments sont principalement régit par l'ordre 0 ou 1. Dans les articles évoqués ci-dessus, la croissance tumorale est décrite par des simples lois linéaires ou exponentielles à 1 paramètre. Il y a fort à parier qu'une complexification de ces modèles pourrait permettre une amélioration de leur performance.

Ainsi, la différentiation entre les différents tissus tumoraux semble être une hypothèse importante à prendre en compte car l'application d'une thérapie aurait un effet différent suivant l'état d'évolution de la tumeur ciblée. Il est par exemple admis que les cytotoxiques ciblent préférentiellement les cellules en prolifération, alors que les cellules tumorales hypoxiques, en phase quiescente, y sont résistantes (Valeriote and van Putten, 1975; Pawlik and Keyomarsi, 2004). Il est donc important de pouvoir déterminer le moment dans l'évolution cancéreuse où la proportion de cellules en hypoxie est minimale, afin d'optimiser l'impact du traitement sur la masse tumorale. Le tissu hypoxique joue également un rôle important car il est un des responsables de la bascule angiogénique permettant la vascularisation tumorale. On peut donc considérer qu'à une description macroscopique de l'évolution de la masse ou du volume tumoral doit être associé une description plus fine de la structure et de la composition de la tumeur en terme de type cellulaire ou tissulaire. On peut pousser plus loin le raisonnement en essayant de chercher le lien entre les transitions

d'un type cellulaire à l'autre et la régulation de certaines voies moléculaires, cibles privilégiées de certains nouveaux médicaments anticancéreux. Ce raisonnement entraîne une vision multi-échelle du problème comme le présente la figure 1.7.

L'aspect spatial peut également avoir une importance majeure. Il s'agit de rendre compte de l'interaction entre les tissus cancéreux et les tissus sains lors de la croissance tumorale. On sait par exemple que les tumeurs cérébrales sont infiltrantes, elles envahissent rapidement le tissu cérébral grâce à la migration des cellules tumorales le long de la structure en fibres de la substance blanche. Dans d'autres types de cancer, la tumeur est au contraire tout à fait localisée, c'est le cas par exemple du cancer du testicule. La connaissance des caractéristiques spatiales du cancer étudié est donc importante pour apprécier l'évolution de la maladie mais aussi la réponse aux différentes stratégies thérapeutiques. Très logiquement, l'efficacité de la résection par chirurgie d'une tumeur cérébrale dépend fortement du degré d'invasion de la tumeur. De la même, une planification optimale d'un traitement en radiothérapie prendra en compte l'infiltration des cellules tumorales dans le tissu en rajoutant une marge de sureté autour de la tumeur visible.

1.5.2 Hypothèses du travail

Les formalismes multi-échelles, comme illustré figure 1.7 apparaissent comme intéressants pour intégrer des informations et données biologiques de nature et d'échelles différentes. La quantité de connaissances disponibles sur les mécanismes impliqués dans la croissance tumorale ne cesse d'augmenter, notamment avec les progrès récents en analyse haut débit de données d'expression génétique et/ou protéomique.

Réussir à intégrer ces données riches dans des formalismes de modélisation permettrait de rendre compte de la spécificité de chaque tumeur et de pouvoir prédire au mieux leur développement. Pour cela, il faut disposer de formalismes modulables, que l'on peut modifier et paramétrer en fonction du système considéré. On passe ainsi d'un formalisme spécifique à un formalisme général, d'une approche dite "data-driven" à une approche dite "knowledge-driven". La construction d'un modèle est alors basée sur les connaissances disponibles à propos du système complexe lui-même, et non plus sur des données spécifiques à un problème ou une étude. Dans ce contexte, l'intégration de données ne se fait plus dans un objectif de fitting mais dans le but de mettre à jour le système en fonction des connaissances nouvellement acquises et des différentes problématiques considérées. C'est le principe de la prédiction en météorologie où les données quotidiennes sont intégrées à un modèle de prédiction. Cette approche a fait l'objet d'une étude pour la prédiction de

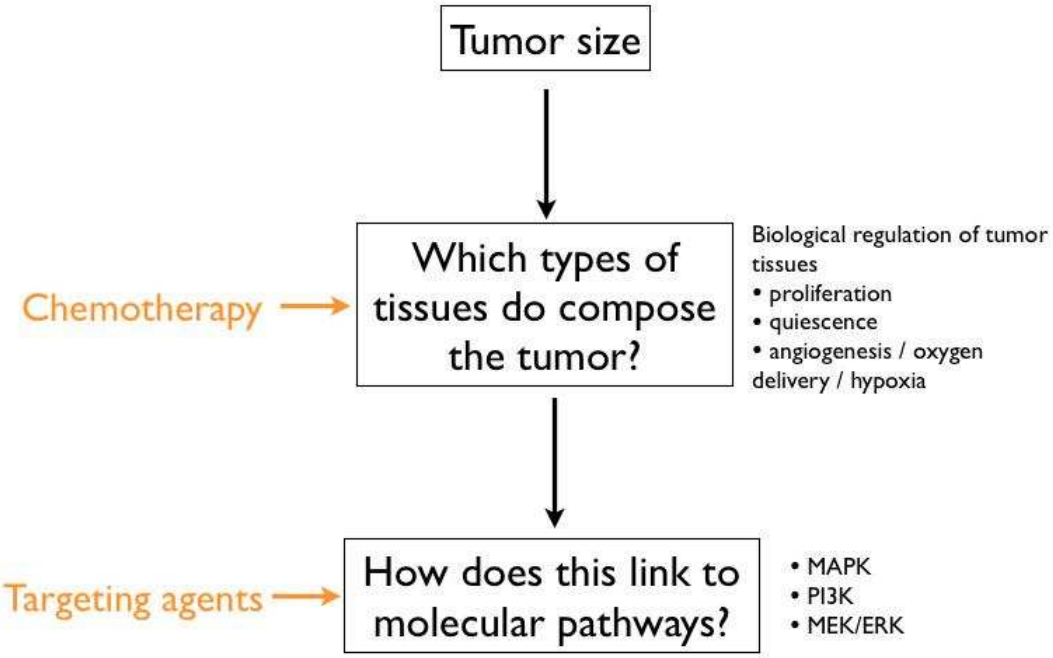

FIGURE 1.7 – Illustration schématique d'une vision multi-échelle de la modélisation du cancer. Si les contributions existantes se sont principalement focalisées sur la description de la dynamique de la taille ou du volume tumoral, une analyse plus fine de la composition tumorale vis-à-vis des différents types de cellules ou tissus peut paraître importante pour décrire au mieux l'efficacité des chimiothérapies. De même le lien avec la dynamique des voies moléculaires semble important pour montrer l'effet des thérapies ciblées.

l'évolution du cancer, dont l'équipe de Thierry Colin à Bordeaux a montré la faisabilité et la pertinence (Lombardi et al., 2012).

De tels modèles permettraient de tester et de valider des hypothèses sur les mécanismes biologiques impliqués dans la morphogénèse tumorale, aussi bien au niveau moléculaire qu'aux niveaux cellulaire et tissulaire. Par ailleurs, la modélisation de l'effet de traitements anti-cancéreux en prenant en compte tous les niveaux impliqués permettrait une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action. Et inversement une bonne compréhension et une bonne représentation des mécanismes d'action de ces traitements permettrait la prédiction computationnelle de l'effet de protocoles innovants. Les connaissances sur des traitements utilisés séparément pourraient aussi permettre, en prenant en compte les processus impliqués, de prédire l'impact de combinaisons et d'optimiser un protocole thérapeutique complexe.

1.5.3 Objectif

La modélisation détaillée de la croissance tumorale, prenant en compte l'hétérogénéité des tissus cancéreux, peut se faire suivant deux formalismes mathématiques distincts : les modèles discrets et les modèles continus. Les modèles discrets sont basés sur des automates cellulaires, où chaque entité est représentée individuellement et réagit à des règles données. Dans les modèles continus, on considère généralement des densités spatiales de cellules dont le comportement est décrit par des équations différentielles. Ces deux formalismes permettent de représenter mécanistiquement les processus de croissance tumorale et l'effet éventuel de traitements.

L'objectif du travail est de poser les bases de l'approche multi-échelles en se basant sur ces deux formalismes et en les appliquant à des problématiques biologiques concrètes. Un formalisme continu a été développé pour représenter la croissance du cancer du côlon et l'angiogénèse tumorale. Il intègre différentes échelles de description, notamment un modèle à équations différentielles ordinaires des voies de signalisation du VEGF. Par ailleurs, un formalisme discret a été employé pour la modélisation du cancer du sein, en particulier l'étude de la formation de structures invasives à partir de cellules épithéliales mammaires mutées, une attention particulière étant portée sur les mécanismes cellulaires impliqués.

Les résultats obtenus sont en l'occurrence très prometteurs, ayant pu d'une part proposer un protocole de combinaison de cytotoxiques et d'anti-angiogéniques en fonction des caractéristiques de la croissance et de la vascularisation d'un

cancer du côlon, et d'autre part identifier à partir d'un modèle relativement simple les mécanismes impliqués dans l'apparition d'un phénotype invasif chez les cellules épithéliales mammaires.

Chapitre 2

État de l'art

Sommaire

2.1 Les premiers modèles en cancérologie 29
2.2 Les modèles pour données précliniques 30
2.3 Les modèles pour données cliniques 32
2.4 Les modèles mécanistiques 36
2.4.1 Aperçu général 36
2.4.2 Distinction entre modèles discrets et modèles continus 38

Dans ce chapitre, nous présenterons le positionnement de notre travail par rapport aux efforts de modélisation de la croissance tumorale et de l'efficacité des traitements.

2.1 Les premiers modèles en cancérologie

La description mathématique de ces problématiques a commencé dans les années 1960. On observe alors que les tumeurs tendent à avoir une croissance exponentielle dont la vitesse diminue à mesure que la taille tumorale augmente, jusqu'à atteindre une limite asymptotique. En 1964, A.K Laird proposait de représenter ce phénomène par la loi de Gompertz (Laird, 1964) :

$$\frac{w}{w_0} = e^{\frac{A}{\alpha}(1-e^{-\alpha \cdot t})} \tag{2.1}$$

où w est la taille tumorale, w_0 la taille tumorale initiale, et A et α des constantes positives. Si l'on prend $\gamma = Ae^{-\alpha t}$, l'équation (2.1) est la solution des deux équations différentielles :

$$\frac{dw(t)}{dt} = \gamma w$$
$$\frac{d\gamma}{dt} = -\alpha\gamma$$

Par une méthode des moindres carrés, les auteurs ont pu estimer les constantes du modèle permettant de reproduire la croissance de différentes xénogreffes de sarcomes et autres tumeurs chez le rat et la souris, décrites dans la littérature.

Ce modèle a été utilisé pour décrire de façon précise la croissance de xénogreffes de plusieurs types de cellules cancéreuses chez des rongeurs (Simpson-Herren and Lloyd, 1970). Les auteurs tempèrent cependant leurs conclusions. En effet, les paramètres estimés pour chaque système sont fortement dépendants du protocole expérimental et des erreurs éventuelles de mesure. Ainsi ces paramètres ne sont pas à considérer comme des constantes décrivant de façon universelle la croissance des tumeurs considérées mais comme des valeurs permettant de représenter le jeu de données particulier utilisé.

En 1972, Sullivan et Salmon ont pu modéliser la croissance tumorale chez des patients atteints de myélomes multiples de type IgG par le modèle de Gompertz (Sullivan and Salmon, 1972). En considérant que à $t = 0, w = w_0$ et à $t = \infty, w = w_0 e^{A_0/\alpha}$, l'équation (2.1) a été reformulée en :

$$\frac{1}{w} \cdot \frac{dw}{dt} = A_0 e^{-\alpha t} \tag{2.2}$$

où le terme $\frac{1}{w} \cdot \frac{dw}{dt}$ est dite *croissance spécifique*. Les paramètres de cette équation ont alors pu être estimés à partir des données expérimentales. Il est ensuite apparu que la dynamique de régression de la taille des tumeurs sous l'effet de chimiothérapies pouvait elle aussi être décrite par une équation de la forme de l'equation (2.2), en remplaçant le terme A positif par un terme B négatif, tout en conservant la même valeur pour le terme α, taux de réduction de la vitesse de croissance tumorale. Les auteurs en ont ainsi conclu que la dynamique de l'effet d'anti-cancéreux était liée à la dynamique de croissance de la tumeur, qu'il serait alors intéressant de considérer cette dernière lors de la mise en place de protocoles thérapeutiques.

Norton et Simon ont ensuite étendu la loi de Gompertz à différents types de tumeurs solides. Tout d'abord sur des modèles animaux : ils ont considéré des données de cellules de mélanomes implantées chez des souris et de cellules de cancer du sein implantées chez des rats. Ils ont ainsi pu estimer les paramètres permettant de reproduire les croissances tumorales (Norton et al., 1976). Puis à partir de données issues de patientes atteintes de cancer du sein, ils ont pu reproduire de façon précise le développement des lésions ainsi que le temps de rechute après une mastectomie (Norton, 1988). En s'intéressant à l'hétérogénéité de la masse tumorale, ils ont mis en évidence l'existence d'une fraction de cellules à croissance rapide, et très sensibles à l'action de cytotoxiques, et d'une fraction de cellules ayant une vitesse de prolifération plus faible et étant plus résistantes au traitement. L'efficacité d'un traitement serait alors optimisée par l'usage de doses fortes sur plusieurs cycles pour limiter la recroissance tumorale entre deux cycles (Norton, 2001). C'est l'hypothèse dite de Norton-Simon (Simon and Norton, 2006), qui a été validée par des essais cliniques en 2003 (Citron et al., 2003). Durant cette étude 2005 patientes présentant un cancer du sein ont été traitées par chimiothérapies appliquées soit séquentiellement, soit simultanément. Le protocole d'application simultanée montre une meilleure réponse au traitement, sans hausse de la toxicité.

2.2 Les modèles pour données précliniques

De plus en plus, on développe des modèles de croissance tumorale intégrant les aspects pharmacocinétiques-phamacodynamiques (PK/PD) de traitements anti-cancéreux, aussi bien pour décrire des données de xénogreffe (préclinique) que des données de patients (clinique).

La modélisation en préclinique actuelle a été largement influencée par les travaux de Simeoni *et al.* qui ont étudié la croissance de xénogreffes de cellules

de cancer ovarien et de cancer colorectal sur des souris athymiques afin d'évaluer l'efficacié de quatre différents agents de chimiothérapie (Simeoni et al., 2004). Un modèle pharmacocinétique des traitements a été établi sur la base de concentrations plasmatiques mesurées au cours du temps. La variation de taille tumorale a été évaluée par des mesures de masse tumorale calculée par la formule : $masse = 1/2 \cdot longueur \cdot largeur^2 \cdot \rho$ où ρ est la densité volumique du tissu tumoral. La dynamique alors observée sur les souris des groupes témoins est en deux phases, l'une exponentielle et l'autre linéaire, ce qui est alors traduit par l'équation suivante :

$$\frac{dw(t)}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot w(t)}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot w(t)\right)^{\Psi}\right]^{1/\Psi}} \tag{2.3}$$

où w est la masse tumorale, λ_0 le taux de croissance exponentiel, λ_1 le taux de croissance linéaire et Ψ un paramètre qui permet, si sa valeur attribuée est suffisamment forte, de voir apparaître un basculement net entre les deux phases de croissance. Toutes les cellules sont alors considérées comme proliférantes. Afin d'intégrer l'effet des chimiothérapies, des états d'endommagement cellulaire croissants sont définis, et on considère que les cellules proliférantes entrent dans le premier état d'endommagement avec un taux k_2 coefficienté par la concentration plasmatique d'anti-cancéreux $c(t)$, et passent aux états suivants avec des taux de transit constant k_1. Le système devient alors :

$$\frac{dw_1(t)}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot w(t)}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot w(t)\right)^{\Psi}\right]^{1/\Psi}} - k_2 \cdot c(t) \cdot w_1(t) \tag{2.4a}$$

$$\frac{dw_2(t)}{dt} = k_2 \cdot c(t) \cdot w_1(t) - k_1 \cdot w_2(t) \tag{2.4b}$$

$$\frac{dw_3(t)}{dt} = k_1 \cdot [w_2(t) - w_3(t)] \tag{2.4c}$$

$$\frac{dw_4(t)}{dt} = k_1 \cdot [w_3(t) - w_4(t)] \tag{2.4d}$$

$$\text{avec } w_1(0) = w_0, w_1(0) = 0, w_2(0) = 0, w_3(0) = 0, w_4(0) = 0,$$

où w_i représente le volume de cellules dans l'état i, le premier étant l'état non endommagé et les suivants les différents stades d'endommagement, w_0 est le volume de cellules au temps d'inoculation. Ce modèle permet de reproduire fidèlement les données experimentales de xénogreffes traitées par chimiothérapie.

En 1999, Hahnfeldt et al. ont proposé d'inclure les phénomènes d'angiogenèse via une nouvelle variable dite de "capacité de charge" qui rend compte

de la vascularisation tumorale (Hahnfeldt et al., 1999). Le modèle est alors le suivant :

$$\frac{dw}{dt} = -\lambda_1 \, w \, log(\frac{w}{k}) \tag{2.5a}$$

$$\frac{dk}{dt} = -\lambda_2 \, k + bS(w,k) - dI(w,k) - ekg, \tag{2.5b}$$

où w est le volume tumoral, et k la capacité de charge. La croissance tumorale est décrite par une loi de Gompertz, définie par l'équation (2.5a). Le volume de la tumeur croît jusqu'à atteindre la valeur limite k qui dépend de la vasculature tumorale, comme défini dans l'equation (2.5b). Le support vasculaire est modifié par un facteur pro-angiogénique S et un facteur anti-angiogénique I, régresse spontanément au taux λ_2 et peut être modifié par des traitements anti-angiogéniques dont l'exposition est représentée par une fonction $g(t)$. Ce modèle permet de prédire de façon correcte l'inhibition de la croissance tumorale par différents traitements anti-angiogéniques sur des souris ayant reçu des xénogreffes de cellules de cancer du poumon.

Enfin, en 2011, un autre modèle a été développé à partir de données relevées sur un protocole expérimental strictement similaire, à savoir des cellules de cancer colorectal injectées dans le flanc de souris athymiques et traitées par chimiothérapie (Ribba et al., 2011) . La dynamique de croissance tumorale alors relevée peut être décrite par une variation linéaire du diamètre tumoral, ce qui contraste avec la dynamique basée sur le poids de la tumeur utilisée par Simeoni et al. (2004). Ainsi la dynamique observée et le modèle alors adopté ne dépendent pas seulement du protocole expérimental, mais sont fortement liés au jeu de données lui-même. Cependant, point intéressant, les auteurs différencient dans le modèle les quantités de cellules tumorale proliférantes, quiescentes et en apoptose, conférant au formalisme un aspect semi-mécanistique.

2.3 Les modèles pour données cliniques

D'autres modèles sont développés pour étudier directement la croissance de tumeurs chez des patients lors d'essais cliniques.

On peut citer des travaux effectués au sein de notre équipe : Ribba et al. (2012), se sont intéressés à la modélisation de l'inhibition de la croissance de gliomes de bas grade, à partir de données cliniques de patients traités par

chimiothérapie et radiothérapie. Le modèle suivant a alors été établi :

$$\frac{dC}{dt} = -KDE \cdot C \tag{2.6a}$$

$$\frac{dP}{dt} = \lambda_P \cdot P\big(1 - \frac{P^*}{K}\big) + k_{Q_P P} \cdot Q_P - k_{PQ} \cdot P - \gamma_P \cdot C \cdot KDE \cdot P \tag{2.6b}$$

$$\frac{dQ}{dt} = k_{PQ} \cdot P - \gamma_Q \cdot C \cdot KDE \cdot Q \tag{2.6c}$$

$$\frac{dQ_P}{dt} = \gamma_Q \cdot C \cdot KDE \cdot Q - k_{Q_P P} \cdot Q_P - \delta_{QP} \cdot Q_P \tag{2.6d}$$

où P^* est la somme des quantités de cellules tumorales proliférantes P, quiescentes Q et quiescentes endommagées Q_P. KDE est le taux de dégradation de la concentration de chimiothérapie C, qui induit des dommages aux cellules prolifératives et quiescents aux taux respectifs γ_P et γ_Q. λ_P est le taux de croissance logistique du tissu proliferatif, k_{xy} le taux de passage de l'état x à l'état y. En fittant les valeurs de P^* ainsi obtenues aux mesures moyennes de diamètre tumoral de patients traités avec un protocole de chimiothérapie, les auteurs ont pu estimer les valeurs des paramètres du système suivant une analyse à effet mixtes. Le modèle a ensuite été testé, avec succès, pour la prédiction de l'efficacité de protocoles thérapeutiques sur la seule base de la dynamique de croissance tumorale avant traitement.

Suivant une autre approche, Tham *et al.* ont construit un modèle de la réduction de la taille tumorale chez des patients ayant un cancer du poumon non à petites cellules traités par gemcitabine et carboplatine, deux chimiothérapies (Tham et al., 2008). L'objectif était d'identifier de nouveaux marqueurs de l'efficacité des traitements. Pour cela les concentrations plasmatiques des drogues ainsi que de leurs métabolites actifs ont été relevées au cours du temps. A partir de ces mesures une analyse non linéaire à effets mixtes a permis d'établir un modèle pharmacocinétique (PK) des deux traitements. En parallèle, un modèle de type Gompertz prédisant l'évolution de la taille tumorale a été construit à partir de mesures de la plus grande largeur de la tumeur :

$$\frac{dSize}{dt} = (RateIn \cdot Effect - \frac{1}{T_{Turnover}} \cdot Size) \cdot Size \tag{2.7}$$

où $RateIn$ est le taux de croissance initial de la tumeur, défini comme le produit de la taille au début de l'étude $Size_0$ et l'inverse du temps de turnover $T_{turnover}$ qui décrit le renouvellement de la tumeur. L'effet des traitements y est pris en compte par le terme $Effect$, fonction de type Emax de l'exposition calculée par le modèle PK.

Ce modèle permet de prédire de façon correcte l'évolution de la taille tumorale à partir des concentrations sanguines de chimiothérapie dans le sang, mais n'a pas permis d'identifier d'autres indicateurs d'effet. Par ailleurs, il ne permet pas de distinguer l'effet des deux traitements indépendamment l'un de l'autre.

Wang *et al.* ont eux aussi cherché à établir un modèle de prédiction pour des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules traités par divers anti-cancéreux (Wang et al., 2009). Ils ont considéré des données de 4 études cliniques différentes afin de modéliser la survie des patients en fonction du taux de réduction de la tumeur et de caractéristiques individuelles. Un modèle d'évolution de la taille tumorale a d'abord été établi à partir de mesures de taille suivant le critère RECIST, analysées avec un modèle non linéaire à effets mixtes :

$$Size_i(t) = Size_{0,i} \cdot e^{(-SR_i \cdot t)} + PR_i \cdot t \tag{2.8}$$

où $Size_i(t)$ est la taille tumorale de l'individu i au temps t, $Size_{0,i}$ la taille tumorale au début de l'étude, SR_i une constante de réduction de taille tumorale et PR_i le taux de croissance tumorale linéaire. PR_i est alors une approximation de la croissance tumorale sous un traitement donné. Un modèle de survie paramétrique a alors pu être établi pour relier les facteurs de risque et les changements de taille tumorale calculés par l'équation précédente, au temps de survie. Les facteurs de risques les plus significatifs uniquement ont été conservés, pour aboutir à l'expression suivante :

$$log(T) = \alpha_0 + \alpha_1 \cdot ECOG + \alpha_2 \cdot (Size_0 - 8.5) + \alpha_3 \cdot PTR_{w8} + \epsilon \tag{2.9}$$

où T est le temps de survenue de la mort du patient, α_0 l'intercept du modèle, α_1, α_2 et α_3 respectivement les pentes pour le statut ECOG [1], $Size_0$ la taille tumorale au début de l'étude, et le pourcentage de réduction de la tumeur à la 8ème semaine PTR_{w8}, évaluée à partir du modèle de croissance tumorale (eq. (2.9)). Ainsi, à partir de la variation de la taille tumorale après 8 semaines de traitement, de la taille tumorale initiale et l'impact du cancer sur la qualité de vie du patient (critère ECOG), il est possible d'estimer les chances de survie et donc d'adapter si besoin le protocole thérapeutique. Cependant, dans ce modèle, la dose ou l'exposition au traitement ne sont alors pas pris en compte, limitant les possibilités de transposition à d'autres situations.

Une approche similaire a été utilisée par Claret *et al.* pour prédire la survie de patients atteints de cancer colorectal et traités par chimiothérapie dans un

1. le statut ECOG est un critère permettant d'évaluer la progression d'un cancer en fonction de son impact sur la qualité de vie du patient (Oken et al., 1982)

essai de phase III, en se basant sur des données longitudinales de croissance tumorale (sommes des plus grandes largeurs des lésions tumorales, critère RECIST) relevées dans d'autres études cliniques (Claret et al., 2009). En particulier une analyse non linéaire à effets mixtes sur des données issues d'un essai de phase II pour l'évaluation de la capecitabine et de données historiques de patients traités par du 5-FU en phase III a permis d'établir le modèle de croissance tumorale suivant :

$$\frac{dSize}{dt} = K_L \cdot Size(t) - K_D(t) \cdot Exposure(t) \cdot Size(t) \tag{2.10}$$

où K_L est le taux de croissance de la tumeur, K_D le taux d'élimination de cellules tumorales par le traitement, qui décroit de façon exponentielle avec un taux λ ($K_D(t) = K_{D,0} \cdot e^{-\lambda \cdot t}$). *Exposure* est l'exposition de la tumeur au traitement, qui en l'absence de données pharmacocinétiques, est estimée directement par la dose journalière. La survie des patients a alors pu être représentée par un modèle de survie paramétrique de distribution log-normale. Les variables explicatives sont la taille tumorale au début de l'étude et la variation relative de la taille entre le début du traitement et la 7ème semaine, estimée à partir du modèle de croissance tumorale (eq. (2.10)). L'expression de la survie est alors très similaire à celle obtenue par Wang *et al.* (eq. (2.9)), la réponse de la tumeur après environ 2 mois de traitement, couplée à la taille tumorale initiale, s'avère être un critère déterminant dans l'espérance de survie du patient, et donc à prendre en compte pour éventuellement modifier le traitement.

Ces quatres modèles, bien que considérant le même indice, à savoir la taille tumorale, aboutissent à des lois de croissance différentes. Cela peut s'expliquer tout d'abord par le fait que les équipes ont considéré des tumeurs de nature différente, Claret *et al.* s'intéressant au cancer colorectal, Ribba *et al.* au gliome, et les deux autres au cancer du poumon non à petites cellules. Mais ainsi, entre Wang *et al.* et Tham *et al.* la différence ne tient qu'au critère utilisé pour évaluer la taille tumorale. Ces modèles développés sont donc très dépendants du jeu de données employé pour l'étude. Cela est d'autant plus vrai que les modèles développés par Wang *et al.* et Claret *et al.* ne prennent pas en compte la distribution des traitements dans l'organisme ni ne décrivent précisément leurs effets sur la tumeur. Dans le premier cas, l'effet du traitement est seulement décrit par un paramètre de réduction de la taille tumorale, estimé à partir des mesures expérimentales, tandis que dans le second, la quantité de traitement atteignant la tumeur est approximée à partir de la dose administrée, et son effet décrit par une constante. Or une grande variabilité peut exister d'un individu à l'autre pour l'assimilation d'un traitement.

On peut par ailleurs critiquer l'utilisation de la somme des plus grandes

largeurs des lésions cancéreuses (telle que définie pour le critère RECIST) ou de la simple mesure de la largeur de la tumeur pour évaluer la taille tumorale. Il a en effet été montré précédemment qu'il existe de meilleures mesures, plus informatives. Ces modèles sont trop descriptifs, il faudrait prendre en compte les mécanismes de croissance tumorale de façon plus détaillée, et considérer l'hétérogénéité de la lésion cancéreuse, afin de s'affranchir des variations ponctuelles liées aux expérimentations et pouvoir étudier plus avant l'effet des anticancéreux.

Enfin, il est important de noter que le modèle de Simeoni a aussi été exploité avec succès pour prédire la réponse à différentes chimiothérapies chez l'homme à partir de données de xénogreffes sur des souris (Rocchetti et al., 2007). Un nouveau paramètre est introduit, C_T qui correspond à la concentration palier telle que si la concentration de drogue à l'équilibre dépasse cette valeur, la tumeur est totalement annihilée : $C_T = \lambda_0/k_2$, où k_2 est le paramètre utilisé équation (2.4a), et qui décrit alors le potentiel anti-tumoral du traitement. La pharmacocinétique de chaque traitement a été établie avec des modèles à plusieurs compartiments standards, et en utilisant les données de croissance tumorale chez les souris des groupes témoin et traité, les paramètres k_2 et C_T ont été estimés pour chaque traitement. Les valeurs de k_2 ont alors été comparées à l'AUC (Area Under The Curve, mesure qui décrit l'exposition au traitement au cours du temps) obtenue chez l'homme pour des traitements de dose moyenne par rapport aux doses données habituellement en clinique. Une forte corrélation est alors observable. De même, on voit un lien important si les valeurs de C_T estimées sont comparées à la dose reçue lors d'un traitement moyen. Ainsi un tel modèle pourrait permettre d'extrapoler les résulats obtenus sur des modèles animaux à des protocoles utilisables chez l'homme.

2.4 Les modèles mécanistiques

2.4.1 Aperçu général

Des modèles plus complexes ont aussi vu le jour qui prennent en compte la mise en place d'une vascularisation tumorale, ou décrivent la répartition spatiale des cellules. On peut par exemple citer les travaux de Arakelyan *et al.* qui ont développé un modèle complexe de croissance tumorale vascularisée (Arakelyan et al., 2002). L'algorithme, composé d'un système d'EDOs (équations différentielles ordinaires), décrit les relations entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales composant les vaiseaux sanguins, via la production d'an-

giopoïétines et de VEGF. La néovasculature se forme sous l'action du VEGF produit par des cellules tumorales hypoxiques, et les vaisseaux maturent suivant les quantités relatives d'angiopoïétines. Gorelik *et al.* ont utilisé ce modèle pour prédire l'effet de différents traitements appliqués sur des xénogreffes de chondrosarcome mésenchymal (tumeur se développant dans le cartilage) issues d'un patient particulier (Gorelik et al., 2008). Un modèle PK compartimental a été adopté pour décrire tous les traitements considérés et leurs effets décrits par une fonction de leur concentration. Le modèle a d'abord été calibré suivant les vitesses de croissance des xénogreffes, et affiné pour améliorer la concordance entre prédictions et résultats expérimentaux. Puis en se basant sur la vitesse de progression du chondrosarcome chez le patient, le modèle a été adapté pour prédire un protocole thérapeutique optimal qui a montré de bons résultats. Ainsi la modélisation pourrait permettre le passage de modèles animaux à estimations pour des patients réels, et permettre de proposer un traitement personnalisé.

Dans une approche plus théorique, un modèle de croissance de cancer colorectal vascularisé a été développé en prenant en compte plusieurs échelles de description (Ribba et al., 2006a). La régulation génétique des cellules est représentée par un modèle booléen qui définit, en fonction des mutations subies, la réaction des cellules aux stimuli externes que sont l'hypoxie, la surpopulation et les signaux de croissance. Les cellules progressent dans le cycle cellulaire suivant un modèle discret et la croissance de la tumeur et sa répartition spatiale sont représentées au niveau tissulaire par un système continu d'EDPs basé sur la loi de Darcy pour l'écoulement de liquides dans un milieu poreux. Des simulations ont alors permis de comparer l'effet de différents protocoles d'irradiation et ont mis en évidence une meilleure efficacité lorsque le traitement est synchronisé avec le cycle cellulaire.

Notre équipe a par ailleurs aussi développé un modèle de croissance tumorale avasculaire pour étudier l'effet d'inhibiteurs de MMPs (Ribba et al., 2006b). Comme dans le travail précédent, les cellules parcourent le cycle cellulaire et leur répartition dans l'espace est décrite par un système d'EDPs. Par ailleurs un système décrit la matrice extracellulaire, qui est dégradée par les MMPs sécrétées par les cellules tumorales. L'inhibition de ce processus favorise le passage des cellules proliférantes en phase quiescente, le nombre de ces dernières est donc choisi comme indicateur de l'effet du traitement. Le modèle montre alors l'apparition de résistances de la tumeur envers le traitement, ce qui est en accord avec ce qui avait été observé en clinique.

2.4.2 Distinction entre modèles discrets et modèles continus

Les modèles discrets sont basés sur des automates cellulaires, où chaque entité est représentée individuellement et réagit à des règles biophysiques données. Il est alors possible de traduire de façon détaillée des processus biologiques, comme la progression dans le cycle cellulaire, les mutations génétiques causant des variations phénotypiques, ou l'adhérence entre cellules. Au sein des formalismes discrets, on peut distinguer les modèles construits sur des domaines géométriques définis (dits lattice-based) où les cellules sont représentées comme un ensemble de points ou de surfaces d'une grille, et les modèles dits "lattice-free" dans lesquels la conformation des cellules n'est pas dépendante de la structuration de l'espace de simulation.

Ce type de formalisme est très utile pour étudier la carcinogénèse, la sélection naturelle, et les interactions entre les cellules entre elles et le microenvironnement. Le principal inconvénient de ce type de modèle est le temps de calcul augmentant rapidement avec le nombre de cellules considérées, ce qui limite les possibilités en terme d'étendues spatiale et temporelle. Il est alors difficile de simuler les quelques centaines de milliers de cellules qui constituent 1 mm^3 de tissu tumoral.

Les modèles continus sont souvent plus adaptés pour des systèmes d'échelle large. La tumeur est alors décrite par une fonction qui peut suivre la quantité totale de cellules, le rayon d'une tumeur sphérique ou les densités (ou fractions volumiques) de cellules, suivant la problématique considérée. Les variables étant vues comme des champs continus, leur évolution peut être décrite par des systèmes d'équations différentielles ou intégro-différentielles inspirées par des lois de mécanique et de dynamique des fluides. Les concentrations de composants moléculaires diffusant dans les tissus (oxygène, nutriments, molécules thérapeutiques) peuvent aussi être intégrées.

Il existe enfin des modèles couplant les approches discrète et continue afin d'intégrer les processus moléculaires et cellulaires à la description de la dynamique tissulaire. Les cellules peuvent y être considérées comme des entités discrètes dont le comportement est conditionné par les concentrations continues de molécules diffusant dans les tissus. Une autre approche, dite approche hybride, permet de décrire la masse tumorale comme contenant à la fois des éléments discrets, au niveau cellulaire, et des éléments continus au niveau tissulaire.

Nous ferons une brève revue des efforts de modélisation des systèmes bio-

logiques auxquels nous nous sommes intéressés, à savoir les mécanismes impliqués dans la morphogénèse tumorale et la croissance de tumeurs vascularisées en introduction des travaux associés. Nous n'aborderons pas la très vaste littérature concernant la modélisation de l'angiogenèse tumorale. Le lecteur trouvera des revues complètes dans Mantzaris et al. (2004); Chaplain et al. (2006).

Chapitre 3

Modèle continu, multi-niveaux de croissance de tumeur solide et d'angiogénèse

3.1 Avant-propos

Depuis de nombreuses années, l'angiogénèse est reconnue comme un processus fondamental de la croissance tumorale et du développement du cancer (Folkman, 2002). La découverte de certains des facteurs angiogéniques, tels que le VEGF ou l'endostatine, a ouvert la voie au développement de thérapeutiques ciblées dont le but est d'appauvrir la tumeur en oxygène et nutriments, éléments indispensables à sa croissance. En clinique, il est apparu que ce type d'agent thérapeutique pouvait conduire à une forte toxicité, contraignant ainsi son administration à des doses faibles, et en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles (Jain, 2005). De nos jours, une dizaine de médicaments anti-angiogéniques sont commercialisés, et bien que certains d'entre eux aient montré, lors d'essais randomisés, un gain de survie dans différentes pathologies - c'est le cas pour le cancer colorectal avec l'association de l'anti-angiogénique Bevacizumab et d'une chimiothérapie conventionnelle - l'apport de ces agents reste malgré tout modeste. L'élaboration de protocoles thérapeutiques optimisés basés sur une meilleure compréhension des interactions entre dynamique tumorale, anti-angiogéniques et chimiothérapies, pourrait conduire à une meilleure efficacité de cette stratégie thérapeutique (Jain, 2005).

Le réseau vasculaire tumoral est par nature hétérogène, tortueux, hyperperméable et caractérisé par un faible débit sanguin et une hypertension du liquide interstitiel (IFP) dans la tumeur (Jain, 2001).

De nombreuses études menées chez l'animal montrent que plusieurs molé-

cules anti-angiogéniques entraînent une normalisation de la vasculature tumorale par diminution de la perméabilité vasculaire, ainsi que de la surface et de la densité des vaisseaux . Il en résulte finalement une augmentation transitoire du débit sanguin tumoral et une chute de l'IFP, après quelques jours de traitement (sunitinib : Czabanka et al. (2009) ; bevacizumab : Dickson et al. (2007), sorafenib : Wilhelm et al. (2006)).

Par ailleurs, une étude clinique, menée chez six patients atteints de cancer rectal a montré que 12 jours après l'administration d'une dose de 5 mg/kg de bevacizumab, le réseau vasculaire tumoral est moins dense, plus régulier, permettant ainsi un meilleur débit sanguin (Jain, 2001). Il est possible que l'administration de l'agent anti-angiogénique, en entraînant une normalisation de l'hémodynamique tumorale, permette aussi une meilleure pénétration dans le tissu cancéreux de la chimiothérapie associée. L'association anti-angiogénique/chimiothérapie pourrait être ainsi fortement bénéfique.

Cependant, pour pouvoir identifier les protocoles optimaux de cette association, il faut pouvoir répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les caractéristiques (durée, amplitude) de la fenêtre de la normalisation des vaisseaux ?
- Comment ces caractéristiques sont-elles reliées à la dose et au protocole d'administration de l'anti-angiogénique ?
- Quel est le bénéfice de cette normalisation pour l'efficacité de la chimiothérapie associée ?

Des études récentes montrent que ce problème est trop complexe pour être exploré de façon empirique, par la succession d'essais et d'échecs. D'une part, les caractéristiques biologiques de la tumeur peuvent jouer un rôle déterminant : dans Ma et al. (2003), il est montré que l'anti-angiogénique semaxinib diminue le rapport concentration tissulaire (tumorale) versus concentration plasmatique d'une chimiothérapie (le temozolomide) de 24% dans les tumeurs sous-cutanées, mais augmente ce rapport de 100% dans les tumeurs intracérébrales. D'autre part, le délai entre les administrations de l'anti-angiogénique et de la chimiothérapie est important : dans Dickson et al. (2007), l'anti-angiogénique bevacizumab augmente la pénétration tumorale du topotecan de 81% lorsque le topotécan est donné 1 à 3 jours après le bévacizumab, par rapport à une administration concomittante. Dans cette même étude, l'effet anti-tumoral suit le même ordre (Dickson et al., 2007). À la complexité de la physiologie de la vascularisation tumorale s'ajoute donc une complexité dans le mode d'action et la cinétique de l'effet des médicaments. Enfin, la quasi-totalité des travaux détaillés de pharmacologie sur les anti-angiogéniques et

leurs associations ont été conduits chez l'animal (par exemple Guibal et al. (2010)). Ces travaux permettent de mettre en évidence des critères qualitatifs importants mais il est difficile d'extrapoler les résultats de ces études animales à des études cliniques.

Des formalismes de modélisation continus peuvent permettre de décrire l'hétérogénéité du tissu tumoral.

Un des premiers modèles continus décrivant la croissance tumorale dans l'espace a été proposé par Greenspan, pour décrire l'évolution du rayon R(t) d'une tumeur considérée sphérique (Greenspan, 1972). L'augmentation du rayon correspond à la prolifération des cellules cancéreuses, limitée par la quantité de nutriments, qui est représentée simplement par une concentration d'oxygène diffusant dans les tissus. Les cellules proliférantes consomment les nutriments, et les cellules n'en recevant pas assez entrent en nécrose. De plus un facteur inhibant la prolifération est sécrété depuis le milieu de la tumeur et diffuse dans le tissu cancéreux. Lorsque la concentration de ce facteur dépasse un seuil donné, la prolifération des cellules est inhibée. On voit alors apparaître une structure en anneaux concentriques, avec un cœur nécrosé, une bande de cellules quiescentes et un anneau extérieur de cellules proliférantes. La convergence vers un état stationnaire a pu être mise en évidence, en accord avec des observations faites in vivo (Sutherland et al., 1986). Greenspan a par la suite modifié ce modèle pour étudier la robustesse à des perturbations de la sphéricité initiale de la tumeur virtuelle (Greenspan, 1976).

Par ailleurs, d'autres modèles ont été développés pour étudier le rôle d'inhibiteurs de prolifération et analyser la stabilité de la croissance tumorale, suivant différentes géométries (Shymko and Glass, 1976). McElwain et Ponzo ont considéré l'impact d'une consommation de l'oxygène variable (McElwain and Ponzo, 1977), puis McElwain et Morris (McElwain and Morris, 1978) ont étudié l'effet de l'apoptose en intégrant un taux de dégradation cellulaire même dans les régions proliférantes de la tumeur. Cristini *et al.* se sont intéressés à la modélisation non linéaire de morphologies tumorales complexes (Cristini et al., 2003). Ils ont montré que l'on peut réduire à deux le nombre de paramètres nécessaires à la description de la croissance tumorale. De plus, une modification de la morphologie de la tumeur peut mener à l'apparition d'irrégularités, vers une progression infiltrative (Cristini et al., 2009).

Byrne et Chaplain ont étudié l'évolution du rayon de tumeurs sphériques avant l'apparition d'une phase nécrosée, en considérant uniquement des cellules proliférantes subordonnées aux nutriments diffusant dans le milieu, et à un inhibiteur. Ils intègrent un mécanisme de dégradation des cellules (Byrne and Chaplain, 1995). Puis ce modèle a été complexifié pour rendre compte

de la présence d'un cœur apoptotique (Byrne and Chaplain, 1996). Chaplain a par ailleurs détaillé des modèles décrivant les trois phases de la croissance tumorale : développement avasculaire, angiogénèse et développement vasculaire (Chaplain, 1996). La phase avasculaire est similaire au modèle présenté dans Byrne and Chaplain (1995). Le modèle d'angiogénèse avait été présenté dans Chaplain and Stuart (1993). Une densité de cellules endothéliales est attirée par des facteurs angiogéniques sécrétés par la tumeur et diffuse dans le tissu suivant une équation de diffusion-chimiotaxie. La croissance vasculaire est quand à elle modélisée en intégrant un facteur favorisant la prolifération cellulaire. Ces modèles permettent d'étudier différentes problématiques et donnent lieu à des morphologies tumorales variées.

La plupart de ces modèles permettent de reproduire des observations faites *in vitro* ou *in vivo*, mais à chaque fois, on considère qu'à une position donnée, on ne trouve qu'un seul type de cellules, ce qui n'est pas réaliste d'un point de vue biologique.

Afin de prendre en compte cette hétérogénéité, un formalisme couramment utilisé est la modélisation du tissu tumoral comme un fluide multi-phasique, où chaque phase correspond à une densité de cellules d'un type donné, dans un milieu saturé. Ainsi les densités relatives à une position reflètent les quantités relatives de cellules tumorales, qu'elles soient proliférantes ou nécrosées, de matrice extracellulaire ou de tissu sain, etc. La dynamique du système est alors décrite par un ensemble d'équations aux dérivées partielles (EDPs). Un des premiers modèles proposé prenait en compte deux phases incompressibles : l'une représentant les cellules tumorales, l'autre le fluide extracellulaire (Please et al., 1998). La prolifération des cellules est régulée, comme dans les modèles précédents, par la quantité d'oxygène diffusant dans le milieu. Mais l'apparition d'un cœur nécrotique n'est pas seulement due à un manque d'oxygène, mais aussi aux contraintes créées si la pression du fluide est plus importante que celle des cellules tumorales. Ce modèle a ensuite été étendu pour prendre en compte une tension de surface, dans une géométrie sphérique (Please et al., 1999).

Des modèles ont ensuite été développés pour prendre en compte une phase de cellules proliférantes et une phase de cellules nécrosées. On peut par exemple citer les travaux de Ward et King (Ward and King, 1997, 1999) et de Breward *et al.* (Breward et al., 2002) qui ont incorporé un modèle d'adhésion entre les

cellules. Les modèles utilisés sont alors de la forme :

$$\frac{dn}{dt} + \nabla \cdot (\mathbf{v}_n n) = \nabla \cdot (D \nabla n) + \lambda(n, C_i) - \mu(n, C_i) \tag{3.1}$$

$$\frac{dm}{dt} + \nabla \cdot (\mathbf{v}_m m) = +\mu(n, C_i), \tag{3.2}$$

où n est la fraction volumique de cellules proliférantes, m la fraction volumique de cellules nécrosées, $\mathbf{v}_n$ et $\mathbf{v}_n$ leurs vélocités respectives, D un terme de diffusion, λ le taux de production, mu le taux de mort cellulaire, tous deux dépendants des molécules diffusant dans le milieu C_i, activatrices (oxygène, nutriments, facteurs de croissance), et inhibitrices.

Ce type de modèle peut être étendu pour décrire plusieurs types de cellules tumorales, si l'on veut considérer des fractions volumiques ayant une mutation particulière, ou séparer les cellules en fonction de leur position dans les phases du cycle cellulaire. La dynamique de chaque phase Φ_i est alors représentée par une équation de réaction-diffusion du type :

$$\frac{d\Phi_i}{dt} + \nabla \cdot (\mathbf{v}_i \Phi_i) = \nabla \cdot (D_i \nabla \Phi_i) + \lambda_i(\Phi_i, C_i) - \mu_i(\Phi_i, C_i) \tag{3.3}$$

Sherratt and Chaplain (2001) proposent ainsi un modèle séparant les cellules tumorales en densités proliférantes, quiescentes et nécrotiques. Les cellules changent de type en fonction des nutriments diffusant dans le milieu et leur migration est inhibée par contact. Les auteurs peuvent alors décrire mathématiquement les fronts d'onde obtenus pour la propagation des différents types cellulaires. Certains des modèles évoqués dans la partie 2.4 sont en fait des formalismes continus multi-phasiques. Par exemple les modèles de Ribba et al. (2006a) et Ribba et al. (2006b) décrivent les populations de cellules tumorales comme différentes phases d'un fluide, chaque phase correspondant à un stade du cycle cellulaire.

On peut par ailleurs citer les travaux de Billy et al. (2009) qui utilisent une approche similaire pour définir la masse tumorale. Le modèle prend en compte des densités de cellules endothéliales qui peuvent former des vaisseaux en direction de la tumeur sous l'action antagoniste de facteurs angiogéniques sécrétés par la tumeur, et d'inhibiteurs d'angiogénèse produits par le tissu sain. Ce modèle, théorique, est alors utilisé pour simuler l'action d'une thérapie par endostatine.

Un autre formalisme fréquemment utilisé est la méthode dite de "level-set" qui consiste à identifier une interface entre deux tissus. Macklin et al. (2009) décrivent ainsi une densité de cellules tumorales au sein de laquelle ils identifient différentes régions en fonction de leur oxygénation. Les cellules incluses

dans ces régions sont alors dites nécrotiques, quiescentes ou proliférantes et leur taux de prolifération, qui influe sur leur vélocité varie en conséquence. Ce modèle est couplé à un modèle d'angiogenèse basé sur une densité de cellules endothéliales stimulées par des facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales hypoxiques. Les auteurs étudient ainsi l'effet du stress dû à la pression créée par la prolifération des cellules tumorales sur la vasculature et sur la diffusion des nutriments, ainsi que l'effet de la dégradation de la matrice extracellulaire par la masse tumorale sur la répartition des néo-vaisseaux.

De nombreux autres modèles existent qui décrivent la croissance tumorale à différents stades, en incluant ou non les phénomènes d'angiogénèse, de façon discrète ou continue. Leur énumération dépassant le cadre de ce manuscrit, nous invitons le lecteur à se reporter aux très bonnes revues des efforts de modélisation suivantes : Lowengrub et al. (2010), Roose et al. (2007) Chaplain et al. (2010), et Rejniak and Anderson (2011)

L'objectif du travail présenté dans l'article ci-après est de développer un modèle mathématique continu intégrant aussi bien les mécanismes moléculaires que la dynamique tissulaire de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. Ce modèle est alors utilisé pour simuler l'action conjointe d'un agent anti-angiogénique et d'un traitement cytotoxique pour déterminer un protocole de combinaison optimal. Une vision schématique du modèle est donnée figure 3.1

3.2 Article : Analysis of the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy with a tumour growth inhibition multiscale model

L'article présenté ici a été soumis au Journal of Theoretical Biology en aout 2012. Il est actuellement en révision.

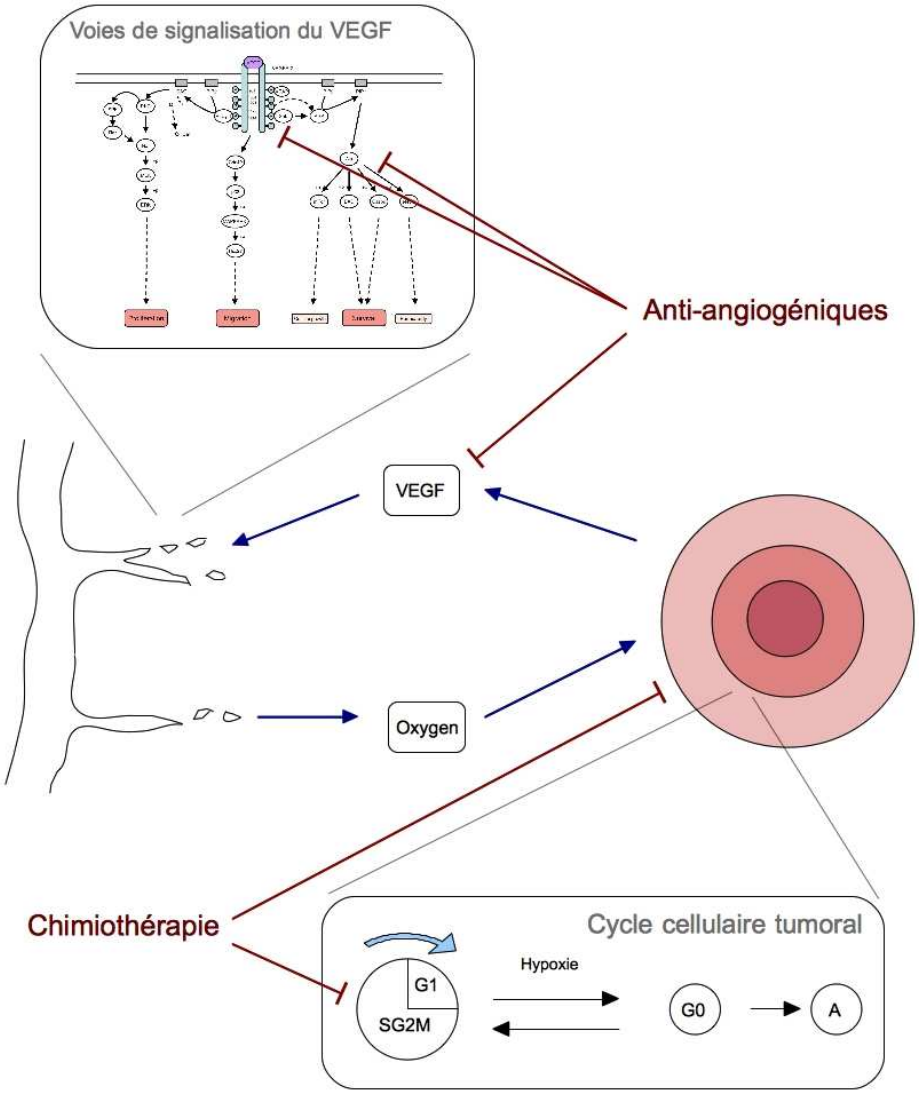

FIGURE 3.1 – Représentation schématique du modèle continu multi-niveaux de croissance tumorale et d'angiogénèse.

A theoretical investigation of the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy with a tumour growth inihibition multiscale model

F. Lignet[a,b], S. Benzekry[c], S. Wilson[b], F. Billy[d], O. Saut[e], M. Tod[1], B. You[f], A. Adda Berkane[g], S. Kassour[g], M.X. Wei[g], E. Grenier[a,b], B. Ribba[b,*]

[a] *Université de Lyon, 69003 Lyon, France; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Unité de Mathématiques Pures et Appliquées, CNRS, UMR5669, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France*

[b] *INRIA, Project-team NUMED, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France*

[c] *Center of Cancer Systems Biology, St. Elizabeth's Medical Center of Boston, Tufts University School of Medicine, Boston, MA 02135 USA*

[d] *Inria Paris-Rocquencourt, Domaine de Voluceau, Rocquencourt, B.P. 105, F-78153, Le Chesnay, France and UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR 7598, Laboratoire Jacques-Louis Lions, F-75005, Paris, France*

[e] *Université Bordeaux 1, Institut de Mathématiques de Bordeaux, CNRS, UMR5251 and INRIA Bordeaux Sud-Ouest EPI MC2, 351 cours de la libération, 33405 Talence cedex, France.*

[f] *Centre d'Investigation de Thérapeutiques en Oncologie et Hématologie de Lyon (CITOHL), Oncologie Médicale, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon; Université Lyon 1, EMR UCBL/HCL 3738, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France*

[g] *Cellvax Laboratory facility, Bâtiment Marcenac, aile Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort cedex, France.*

Abstract

Antiangiogenic drugs were developed with the aim to inhibit the formation of intratumoural blood vessels and in consequence the growth of solid tumours. As these drugs are generally combined with classical cytotoxic drugs in the treatment of cancer patients, finding the optimal combinations remains a complex challenge due to possible interactions of the antiangiogenic compound with the hemodynamic property of the treated tumour. To analyze this problem, we developped a multiscale model of vascular tumour growth combining a molecular model of VEGF signalling pathways and a tissue model of the tumour expansion including the dynamics of cellular and tissue processes of tumour growth and response to treatments. We addressed the potential impact of antiangiogenic drug by defining a new index of vasculature quality which depends on the balance between stable and unstable vessels within the tumour mass. Our goal was to investigate the interactions between a chemotherapy and a antiangiogenic treatment, and, by simulating the model, to identify the optimal delay of chemotherapy delivery after the administration of the antiangiogenic compound. This theoretical analysis could be used in the future to optimize antiangiogenic drug delivery in preclinical settings and to facilitate the translation from preclinical to clinical studies.

Keywords: Drug combination; mathematical models; vascular tumour growth.

* *Corresponding author*: Tel.: +33 476 615 217

Email addresses: floriane.lignet@ens-lyon.fr (F. Lignet), benzekry@phare.normalesup.org (S. Benzekry), shelby.wilson@inria.fr (S. Wilson), billy@math.cnrs.fr (F. Billy), olivier.saut@math.u-bordeaux1.fr (O. Saut), michel.tod@chu-lyon.fr (M. Tod), benoit.you@chu-lyon.fr (B. You), amine@cellvax-pharma.com (A. Adda Berkane), souad@cellvax-pharma.com (S. Kassour), ming@cellvax-pharma.com (M.X. Wei), emmanuel.grenier@ens-lyon.fr (E. Grenier), benjamin.ribba@inria.fr (B. Ribba)

1. Introduction

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is recognized as a key process in the growth and development of solid tumours (Folkman, 2002). Malignant cells lacking of oxygen and nutrients due to the increase of tumour burden can secrete angiogenic factors to activate the endothelial cells from the nearest blood vessels. When bound to endothelial cell receptors, angiogenic factors activate several intracellular signalling pathways that regulate cell proliferation and migration towards the tumour. This process leads to the formation of a new vascular network that irrigates the tumour with oxygen and nutrients thus promoting its growth.

The discovery of the angiogenic growth factors such as VEGF (vascular endothelial growth factor) or angiogenesis inhibitors like endostatin has prompted the development of antiangiogenic drugs. First monoclonal antibodies (mAbs) such as bevacizumab and more recently receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKis) such as sorafenib or sunitinib have been developed with the aim to starve the tumour by inhibiting the formation of intratumoral blood vessels. In clinical settings, it appears that these types of drugs could lead to significant toxicity profiles, so that their administration was prescribed at low doses, and in combination with conventional cytotoxic treatments, i.e. chemotherapy or radiotherapy (Jain, 2005). Nowadays, around 10 antiangiogenic compounds have been successfully developed and released to the market. Even if some of them have shown a clinical benefit in randomized clinical trials - for example, bevacizumab combined to a conventional chemotherapy regimen was shown to increase survival in colorectal cancer patients (Hochster et al., 2008; Scheithauer and Schmiegel, 2009) - these drugs have not met expectations (Gasparini et al., 2005; He et al., 2012). The development of optimized therapeutic protocols, based on a deep understanding of the interactions between the tumour dynamic, antiangiogenic drugs and chemotherapy, is thought to improve the benefit of this therapeutic strategy (Jain, 2005).

A tumour vascular network is usually chaotic and characterized by a high interstitial fluid pressure (IFP) which impairs blood flow within the tumour (Jain, 2001). Several experiments in animals have shown that blocking angiogenic signalling by the use of antiangiogenic compounds can cause a passive pruning of the abnormal or immature vessels and a remodelling of the remaining vasculature, leading to its "normalization" (Ma and Waxman, 2008; Tong et al., 2004). This normalization results in a decrease of IFP, and in consequence, an improvement of blood flow after several days of treatment (Czabanka et al., 2009; Dickson et al., 2007). In addition to that, a clinical study has shown that in six patients treated for a rectal cancer, 12 days after the administration of a low and unique dose (5 mg/kg) of bevacizumab, the tumoural vascular network was less dense and more regular with an improved blood flow (Jain, 2001). According to these results, it is plausible that the administration of the antiangiogenic agent, by normalizing the hemodynamic property of the tumour vascular network, allows for better penetration of the associated chemotherapy. However, this effect is also believed to be transient, and longer application of the antiangiogenic treatment may cause destruction of the tumour vasculature and as a consequence, the collapse of the intratumoural blood flow (Jain, 2001).

To identify optimal protocols for combining antiangiogenic drugs and cytotoxics, it appears important to properly determine characteristics such as duration and amplitude of the "normal-

ization window", the link between the dose of antiangiogenic and these characteristics, and the benefit of this normalization for the efficacy of the combined chemotherapy (Jain, 2005). Recent studies showed that the problem is too complex to be only solely addressed through classical biological experiments. For instance, it has been observed that besides the intrinsic biological complexity of the angiogenesis process, the type of tumour could drastically affect the effect and the kinetic of antiangiogenic drugs (Ma et al., 2003). In addition to that, almost all pharmacological studies on antiangiogenic drugs and combination with chemotherapy were developed in animals. Even if these studies allow for highlighting qualitative criteria, their results cannot be easily translated to clinical research.

Numerous biomathematical and multiscale models have been developed to better understand the complex mechanisms involved in the process of angiogenesis, its role in tumour growth and the consequences of its inhibition (see Mantzaris et al. (2004) for a review).

Several efforts on multiscale modelling of cancer growth deserve especially to be cited. In this respect, we must highlight the study proposed by Zheng and co-workers (Zheng et al., 2005) that couple a model of tumour growth and a hybrid model of angiogenesis respectively developed by Byrne and Chaplain (Byrne and Chaplain, 1995) and by Anderson and Chaplain (Anderson and Chaplain, 1998). Other groups have investigated the mechanisms leading to abnormal vasculature and its effects on tumour growth and drugs delivery through probabilistic cellular automata (Bartha and Rieger, 2006; Lee et al., 2006; Welter et al., 2008). Few models addressed the issue of the effect of drug combination. Kohandel and co-workers have proposed a continuous model of vascular tumour growth based on tissue dynamics to investigate the effect of combinations of antiangiogenic drugs with radiotherapies (Kohandel et al., 2007). This model implicitly takes into account the molecular mechanisms of angiogenesis by considering that endothelial and tumour cells attract each other, and it considers the variability of the efficacy of the vasculature as a function of the amount of endothelial cells.

More simple models and data-driven models must also by highlighted. In particular, models that integrate tumour size alone have been well established. A standard and robust model, namely the modified-Gompertz model, has been proposed to predict tumour growth inhibition in mice treated with chemotherapeutic compounds (Simeoni et al., 2004; Magni et al., 2006). Additional studies have focused on the translation of these modelling results in mice to gain clinical insights into optimal drug delivery (Rocchetti et al., 2007). Very recently, these types of ODE-based tumour growth inhibition models were also successfully applied to clinical data with some clear application potentials in colorectal cancer (Claret et al., 2009), non small cell lung cancer (Wang et al., 2009) and low-grade gliomas (Ribba and et al, in press).

More specifically focusing on the process of angiogenesis and its inhibition, Hahnfeldt and co-workers have proposed a simple extension of the classical Gompertz model for the process of angiogenesis (Hahnfeldt et al., 1999). In their model, the tumour limiting size, or "carrying capacity" is the result of competition between pro- and anti-angiogenic molecules. This model has been successfully fitted to volume data for Lewis lung carcinoma subcutaneously xenografted in mice either treated or not with different antiangiogenic compounds. This model has been subjected to mathematical analysis to study its main properties highlighting the best strategies to optimize the delivery of antiangiogenic drugs (see for instance d'Onofrio and Gandolfi (2004)). In

2011, we have proposed a more complex model of tumour growth accounting for different types of tumour tissues, and in particular hypoxic tissue that is known to play a crucial role in tumour driving the process of angiogenesis (Pouysségur et al., 2006). The main innovation of this model was the integration, together with tumour size, of classical histological biomarkers such as those commonly retrieved in preclinical studies. This model integrates three types of tissue (proliferative non-hypoxic, hypoxic, necrotic) and shows correct predictions of tumour size progression as well as the percentages of necrotic and hypoxic tissue in 30 mice that were xenografted with either two colorectal cancer cell lines (Ribba et al., 2011).

Closer to the work presented here, we have recently proposed a continuous model of tumour growth and angiogenesis that integrates the competition between pro- and anti-angiogenic factors modelled on the basis of pharmacological laws (Billy et al., 2009). This model was based on previous developments applied to different anticancer treatment strategies (Ribba et al., 2006a,b, 2009). In this model, the tumour growth is determined by an age-structured cell cycle model which distinguishes proliferative, quiescent and apoptotic cells, and through which the progression is dependent on the hypoxia and the local amount of cells. At a tissue scale, the tumour mass is modelled as a multi-phase fluid which spatial dynamics can be simulated using partial differential equations (PDEs) with laws from fluid mechanics. In the model, the vascular network is represented by endothelial cells. It grows and maturates depending on the angiogenic factors secreted by the tumour.

Our goal is to propose herein a theoretical formalism to investigate the action of different antiangiogenic compounds and to evaluate the efficacy of antiangiogenic drugs combined with cytotoxics. To do so, the previous work (Billy et al., 2009) has been extended to:

- Integrate a complex model of the dynamics of the intracellular pathways of VEGF signalling which dictates the rate of proliferation, migration and apoptosis of endothelial cells;
- Derive an index of vasculature quality to assess its efficiency and which will impact the amount of oxygen or drug delivered through the vessels.

The model is used to simulate the combined effect of virtual chemotherapy and antiangiogenic drugs and highlight possible optimal association scheduling between the two treatments. To assess the verisimilitude of the model simulations, we qualitatively compared them to experimental data obtained by our group on mice xenografts.

2. Methods

The model methodology is composed by the following "blocks":

1. The definition of a new index of intratumoural vasculature quality;
2. The development of an ordinary differential equations (ODE) model of VEGF signalling pathway;
3. The model of tumour growth including the dynamic of both endothelial and tumour cells;
4. The model of drug effects;
5. The techniques to evaluate the efficacy of the treatments.

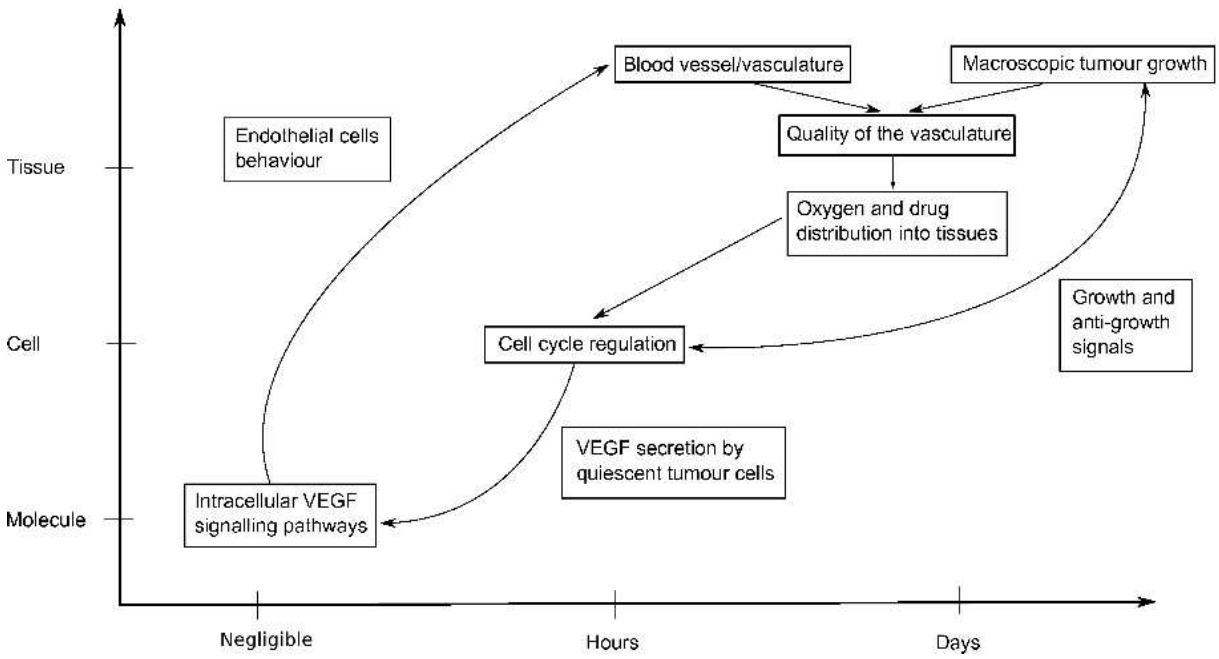

Figure 1: The multiscale model is constituted of a molecular module describing the intracellular pathways of VEGF signalling, a cellular module focusing on cell cycle regulation and a tissue module describing the spatial behaviour of the tumour mass. The endothelial cells, whose activity is mainly dictated by the molecular module, form the blood vessel network in response to VEGF stimuli secreted by tumour hypoxic cells. An index of vasculature quality is derived from the characteristics of the intratumoural vessel network. This affects the diffusion of drugs and oxygen within the tumour.

2.1. New index of vasculature quality

The definition of an index of vasculature quality is a crucial point of our model. It allows us to describe the change in the hemodynamic properties of the tumour due to the antiangiogenic treatment. A good vasculature quality can be correlated to an effective blood flow. The index we propose is derived from the number of endothelial cells constituting immature blood vessels, E, known to be responsible for inefficient blood flow within the tumour. We first compute R as the number of these cells located in the tumour relative to the tumour volume Vol.

$$R = \frac{\int E \, dxdy}{Vol}. \tag{1}$$

We define the index of vasculature quality Π as:

$$\Pi = 1 - \frac{R^{\gamma_n}}{R^{\gamma_n} + R_{0.5}^{\gamma_n}}, \tag{2}$$

where $R_{0.5}$ is the proportion of immature vessel cells which induces a vasculature quality that is the half of the possible maximum value, and γ_n is the sigmoidicity coefficient, that regulates the sharpness of the relationship.

2.2. VEGF signalling pathway

We built a complex model of the intracellular pathways of VEGF signalling to describe the dynamics induced by the angiogenic factor stimulation.

The reconstruction of the intracellular pathways of VEGF was made based on the knowledge available in literature and the dedicated database KEGG[1] (Kyoto Encyclopaedia for Genes and Genomes). We extracted the largest consensus of available sources to build a view of the molecular cascades. A similar work was achieved by Ribba and co-workers in 2006 (Ribba et al., 2006a).

The binding of VEGF to its receptor, the VEGFR-2, at the surface of endothelial cells leads to the phosphorylation of tyrosine residues on the intracellular part of the receptor. This can activate cytoplasmic proteins, and triggers three main signalling pathways. The PLCy1/PKC/MAPK pathway stimulates cell proliferation, the p38/MAPKAPK/Hsp27 pathway activates cell migration and the PI3K/Akt pathway improves the resistance to apoptotic signals, enhances the vessels permeability and stimulates the cell growth. A simplified diagram is given in Figure 2, and full diagram is provided in the Appendix.

The dynamics of the molecular system is translated into a system of ordinary differential equations (ODEs), with the following hypotheses: the molecular concentrations are continuous, reactions happen in a homogeneous medium of a volume large enough, and reactions are deterministic.

For each reaction, we define an equation that describes its dynamics. We distinguish two kinds of reactions: reversible and irreversible. In reversible reactions, $A + B \leftrightarrow AB$, compounds A and B bind to each other to form a stable complex AB at the rate k_1 and the product AB dissociates itself into A and B at the rate k_{-1}. The speed of the reaction depends on the amount of each molecule involved according to the following formula :

$$v = k_1[A][B] - k_{-1}[AB]. \tag{3}$$

In an irreversible reaction, $A \rightarrow B$, a compound A is transformed into B. Under the hypothesis that it is enzyme-catalyzed, this kind of reaction is defined by a maximal speed V and a quantity K which corresponds to the amount of reactant needed to have a reaction speed equal to the half of the maximal speed. The speed of such a reaction, v, is described by a sigmoid function:

$$v = \frac{V[A]}{K + [A]}. \tag{4}$$

We can then associate to each molecule c_i a differential equation that describes its dynamics over time:

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum v_{prod,c_i} - \sum v_{cons,c_i}, \tag{5}$$

where v_{prod,c_i} and v_{cons,c_i} are respectively the velocities of the reactions producing and consuming the molecule c_i (see in the Appendix for the complete set of equations of the system). The

[1] http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

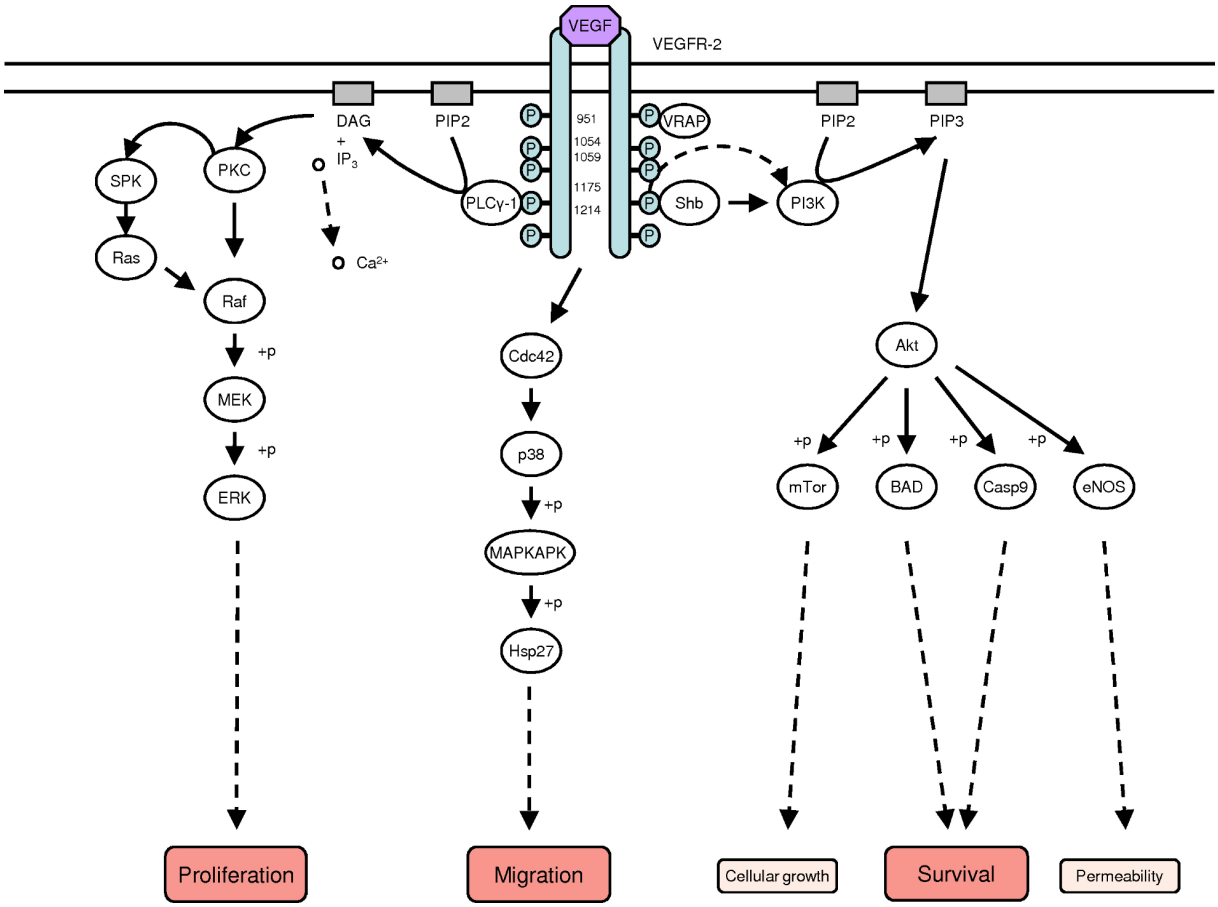

Figure 2: Schematic and simplified view of the VEGF signalling pathways in endothelial cells. VEGF binding to VEGFR-2 activates cells proliferation, migration and resistance to apoptosis (survival). The full model is composed of 64 ordinary differential equations and 98 parameters. A complete representation of the network is provided in the Appendix.

resolution of the system of ODEs gives the general dynamics of the system molecules over time.

To study the effect of the molecular pathways on cellular behaviours, we defined theoretical outputs. They depend on the amount of the last molecules of the intracellular pathway that triggers this cellular mechanism. They are calculated thanks to a sigmoid function with minimal value 0 and maximal 1. We defined outputs for proliferation (p), migration (χ) and resistance to apoptotic signals (a). The values of these outputs are taken at the equilibrium of the system. This way, we obtained a system of 64 ODEs, with 98 parameters. These equations are available in the Appendix. The model parameters were taken from previous publications. In particular, the parameters relative to the proliferation and survival pathways were taken from Hatakeyama et al. (2003) whereas the parameters relative to the migration pathway were estimated based on data presented in Hendriks et al. (2008).

2.3. Model of tumour growth

2.3.1. Endothelial cells dynamics

The tumour is surrounded by mature blood vessels which can sprout new stable (mature) or unstable (immature) vessels. Stimulated by the VEGF secreted by quiescent tumour cells, cells constituting immature vessels proliferate, migrate towards the gradient of angiogenic factor and resist apoptosis. The rates of proliferation $p = p([V])$, migration $\chi = \chi([V])$ and apoptosis $a = a([V])$ depend on the local amount of VEGF $[V]$ and are computed with the molecular model detailed above. Due to the affinity of endothelial cells to each other, migration is reduced by the local amount of endothelial cells. To model the formation of functional blood vessels, when the local number of endothelial cells overtakes a threshold τ_E, unstable vessels will mature. This leads endothelial cells to become a part of mature vessels at a rate μ.

These assumptions permit us to describe the dynamics of endothelial cells constituting immature vessels, E, depending on the quantity of the mature vessel endothelial cells, Es, and on the VEGF-dependant parameters.

$$\begin{aligned}\frac{\partial E}{\partial t} + \nabla \cdot (\chi E (1 - \frac{E}{N_E}) \nabla [V]) \; &= p E (1 - \frac{E + Es}{N_E}) - a_E E \\ &\quad - \mu \mathcal{H}(E + Es - \tau_E) E,\end{aligned} \tag{6}$$

where H is the heaviside function $H(x) = \begin{cases} 1 & \text{if } x \geq 0 \\ 0 & \text{else} \end{cases}$.

Since mature vessels are fixed in the medium, the dynamics of their constituent cells are considered far more simple, as described in the equation:

$$\frac{\partial Es}{\partial t} = \mu \mathcal{H}(E + Es - \tau_E) E - a_{ES} Es. \tag{7}$$

We consider that a vessel is formed in a spatial location when the local amount of endothelial cells is above a given threshold τ_V. Otherwise, neither oxygen nor drug can diffuse from this location.

2.3.2. Tumour cells dynamics

In our model, the tumour is described by an age-structured cell cycle model. The cells can progress through three stages : proliferative (P), quiescent (Q) and apoptotic (A). They evolve in time t and in age a. The proliferative stage is constituted of two phases P_1 and P_2. The passage from P_1 to P_2 is possible only if the local environmental conditions are favourable, i.e. there is enough oxygen ($[O_2] \geq \tau_{1,h}$) and the medium is not overcrowded (the local number of cells is lower than a threshold τ_0). Otherwise, the P_1 tumour cells enter the quiescent stage. Quiescent cells, denoted Q, can return to the proliferative stage, and enter at the beginning of the P_2 phase as soon as the conditions improve. If the local hypoxia is high (i.e $[O_2] \leq \tau_{2,h}$, with $\tau_{2,h} \leq \tau_{1,h}$), P_1 and quiescent cells enter apoptosis. These assumptions are translated into the equations (8) and (9), where $f(x, y, t)$ and $g(x, y, t)$ model the environmental conditions that lead respectively to the entrance of proliferative cells into a quiescent stage and to the entrance of quiescent cells into the apoptotic stage.

$$f(x,y,t) = \begin{cases} 1 & \text{if } \int_0^{a_{max,P_1}} P_1(t,a,x,y)da + 2\int_0^{a_{max,P_2}} P_2(t,a,x,y)da + Q(t,x,y) \leq \tau_0 \text{ and } [O_2] \geq \tau_{1,h} \\ 0 & \text{else} \end{cases} \tag{8}$$

$$g(x,y,t) = \begin{cases} 1 & \text{if } [O_2] \geq \tau_{2,h} \\ 0 & \text{else} \end{cases} \tag{9}$$

Each stage of the cellular cycle corresponds to a phase of a multi-phasic fluid (Ambrosi and Preziosi, 2002; Greenspan, 1972). The variables we consider are then densities of cells. The dynamics of the tissue is ruled by laws from fluid dynamics and is formulated as advection equations:

$$\frac{\partial P_1}{\partial t} + \frac{\partial P_1}{\partial a} + \nabla \cdot (\mathbf{v_{P_1}} P_1) = 0, \tag{10}$$

$$\frac{\partial P_2}{\partial t} + \frac{\partial P_2}{\partial a} + \nabla \cdot (\mathbf{v_{P_2}} P_2) = 0, \tag{11}$$

$$\frac{\partial Q}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v_Q} Q) = g(1-f)P_1(a = a_{max,P_1}) - \left[\frac{\partial f}{\partial t}\right]^+ Q(t^-) + \left[\frac{\partial g}{\partial t}\right]^- Q(t^-), \tag{12}$$

$$\frac{\partial A}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v_A} A) = (1-g)P_1(a = a_{max,P_1}) - \left[\frac{\partial g}{\partial t}\right]^- Q(t^-), \tag{13}$$

where $\mathbf{v_{P_1}}$, $\mathbf{v_{P_2}}$, $\mathbf{v_Q}$ and $\mathbf{v_A}$ represent the velocities of the tumour cells in the different phases of the cell cycle. We assumed that the advection movement is passive, so that $\mathbf{v_{P_1}} = \mathbf{v_{P_2}} = \mathbf{v_Q} = \mathbf{v_A} = \mathbf{v}$. $\left[\frac{\partial h}{\partial t}\right]^+$ and $\left[\frac{\partial h}{\partial t}\right]^-$ represent respectively the positive and negative part of the measure $\frac{\partial h}{\partial t}$, with $h = f$ or g, and they are used to describe the input and output of the quiescent phase due to the change of environmental conditions.

The boundary conditions in age of the proliferative cells that describe the passage between the phases P_1 and P_2 are defined by :

$$\begin{cases} P_1(a=0) = 2P_2(a = a_{max,P_2}) \\ P_2(a=0) = fP_1(a = a_{max,P_1}) + \left[\frac{\partial f}{\partial t}\right]^+ Q(t^-) \end{cases} \tag{14}$$

In order to compute the velocity $\mathbf{v}$, we rely on the hypothesis according to which the velocity is derived from a potential assimilated to a pressure p (Darcy's law for porous media) :

$$\mathbf{v} = -k\nabla p, \tag{15}$$

where $k = k(x,y)$ is a porosity coefficient. In addition to that, we assume that the volume is always saturated: the space is filled by healthy tissue H that is pushed by the expansion of the tumour and so advected with the same velocity $\mathbf{v}$:

$$\frac{\partial H}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v}H) = 0. \tag{16}$$

Eventually, the volume occupied by the endothelial cells is considered as negligible.

In consequence:

$$\int_0^{a_{max,P_1}} P_1 da + \int_0^{a_{max,P_2}} P_2 da + Q + A + H = N_{max}, \tag{17}$$

Summing the equations (10) and (16), integrating in age and using (17), we obtain :

$$\nabla \cdot (\mathbf{v}) = P_2(a = a_{max,P_2}), \tag{18}$$

Using Darcy's law (15), we obtain a solvable equation, endowed with a zero Dirichlet boundary condition :

$$-\nabla \cdot (k\nabla p) = P_2(a = a_{max,P_2}). \tag{19}$$

This set of equations allows us to describe the dynamics of tumour cells over time and space.

The computation of the VEGF and the oxygen field makes a link between the tumour model and the vasculature dynamics. We assumed the VEGF to be secreted by tumour quiescent cells and to stimulate endothelial cells. Oxygen diffuses into the tissue from the endothelial cells and feeds the tumour cells.

VEGF dynamics
Hypoxic quiescent tumour cells secrete VEGF, $[V]$, at a rate $\alpha_{[V]}$. VEGF diffuses in the medium with a diffusion coefficient $K_{[V]}$, is naturally degraded at the rate $\xi_{[V]}$ and is consumed by the immature endothelial cells E at a rate $\delta_{[V]}$, as given in the equation:

$$-\nabla \cdot (K_{[V]}\, \nabla[V]) \;=\; \alpha_{[V]}\, Q_{[0_2]\leq\tau_{1,h}} - \delta_{[V]}\, E[V] - \xi_{[V]}\, [V], \tag{20}$$

where the term $Q_{[0_2]\leq\tau_{1,h}}$ represents the cells that are quiescent due to the lack of oxygen, in opposition to the cells that become quiescent due to overcrowding and don't secrete any VEGF.

Oxygen delivery
Oxygen, $[O_2]$ is brought to the tissue by the vasculature and is consumed by the tumour cells. Its delivery at a given spatial point is possible only if the number of endothelial cells is large enough to form functional vessels, and is dependent on the quality of the vasculature Π defined above:

$$\begin{cases} -\nabla(K_{[O_2]}\nabla[O_2]) = -\sum_\phi \alpha_{[O_2],\phi}\phi \\ [O_2] = \Pi C_{max} & \text{where } Es \geq \tau_v \end{cases} \tag{21}$$

where $\alpha_{[O_2],\phi}$ is the consumption of oxygen by each type of tumour cells $\phi = \{P_1, P_2, Q\}$, τ_v is the minimum amount of endothelial cells needed to form efficient mature vessels, and C_{max} the oxygen concentration on blood.

2.4. Model of drugs effect

Similarly to oxygen, cytotoxic and antiangiogenic drugs diffuse from the vasculature and spread into the tissue. The amount of diffusion depends on the vessel quality Π, which in turn depends on the density of unstable vessels. For each treatment, we define a diffusion equation and describe its effect on the vascular tumour model.

Model of chemotherapy treatment The chemotherapy $[C]$ is delivered through the vasculature. Its concentration in the blood vessels is defined by a function $P_{[C]}(t)$ (defined in eq. (26)) and like oxygen depends on the vasculature quality Π. We assumed the drug concentration to be naturally eliminated with a rate $\xi_{[C]}$ and to diffuse in the tissue with the corresponding equation:

$$\begin{cases} -\nabla \cdot (K \nabla [C]) = -\xi_{[C]}\,[C] \\ [C] = \Pi\, P_{[C]}(t) \qquad\qquad \text{where } Es \geq \tau_v \end{cases} \tag{22}$$

The chemotherapy acts by killing the tumour cells in the last age of the phase P_2. We defined its action on these cells by a sigmoid function. Thus, the equation describing the behaviour of the proliferating P_2 cells becomes :

$$\frac{\partial P_2}{\partial t} + \frac{\partial P_2}{\partial a} + \nabla \cdot (\mathbf{v_{P_2}} P_2) = -P_2(a = a_{max,P_2})\,\frac{E_{max,C}\,[C]}{C_{50} + [C]}, \tag{23}$$

where $E_{max,C}$ is the maximal effect of the chemotherapy and C_{50} stands for the amount of chemotherapy needed to induce half of the maximal effect.

Model of antiangiogenic treatment

We denote the concentration of the antiangiogenic drug by $[AA]$. The antiangiogenic drug inhibits the free VEGF, and is consumed by the reaction with the angiogenic factor via a Michaelis-Menten effect. The equation we use is :

$$\begin{cases} -\nabla \cdot (K \nabla [AA]) = -[V]\,\frac{Emax_{[AA]}\,[AA]}{v_{50}+[AA]} \\ [AA] = \Pi\, P_{[AA]}(t) \qquad\qquad \text{where } Es \geq \tau_v \end{cases} \tag{24}$$

where $P_{[AA]}(t)$ is the concentration of antiangiogenic in the blood vessels depending on time (defined in eq. (26)), $Emax_{[AA]}$ is the maximal effect of the drug and $[AA]_{50}$ is the amount of drug required to produce half of the maximal effect.
As the VEGF is inhibited by the drug, its dynamics becomes :

$$\begin{aligned} -\nabla \cdot (K_{[V]}\,\nabla [V]) =& \alpha_{[V]}\,Q_{[0_2]\leq \tau_{1,h}} - \delta_{[V]}\,E[V] \\ & - \xi_{[V]}[V] - [V]\,\frac{Emax_{[AA]}[AA]}{[AA]_{50} + [AA]}. \end{aligned} \tag{25}$$

Administration protocols

In this work, we considered very simple drug dynamics where drugs are present at a constant concentration in the blood for a given duration.

$$P_{drug}(t) = \begin{cases} Dose_{drug} & \text{if } t \in T_{admin,drug} \\ 0 & \text{else} \end{cases} \tag{26}$$

where $drug = \big[[C], [AA]\big]$, $T_{admin,drug}$ is the time interval of administration of the treatment and $Dose_{drug}$ is the chosen concentration. According to the expressions of drugs dynamics eq. (22) and eq. (24), the amount of drug then delivered into the tissue depends on the global quality of the vasculature.

2.5. Evaluation of treatment effect

We defined several criteria to evaluate the effect of the treatments on the tumour growth, and thus to be able to identify the optimal combinations between the two drug administrations:

- The Time Efficacy Index (TEI)(Simeoni et al., 2004): We look at the delay in time it takes for a treated tumour to reach a size reached by an untreated tumour after 100 time units. The TIE is then computed as :

$$TEI = t(TS_{treated}(t) = TS_{untreated}(T)) - T.$$

  Where TS(t) is the total amount of tumour cells at time t. A positive TEI indicates a delay in tumour growth induced by the treatment, whereas a negative TEI shows an increase in the speed of growth.

- The total amount of chemotherapy delivered in the tissue over the time ($Tot_{[C]}$)

$$Tot_{[C]} = \int [C]_{x,y,t} dxdydt.$$

  Since the quality of the vasculature varies due to the antiangiogenic action, for a same concentration in the blood, depending on the time of application of the combined treatment, the quantity of chemotherapy that reaches the tissue changes.

2.6. Parameter values and experiments to support model predictions

Our model is composed of two main blocks, the molecular system and the cellular and tissular machinery. The parametrization of each was made independently. The molecular pathways model was build first alone, and then integrated the higher level model. The parametrization of the molecular model is detailled in Lignet et al. (2013). For two of the three branches of the signalling pathway, most of these parameters were found in the literature. A couple of parameters at the head of the system had to be estimated (V21 and K21, see Table D.5 and Figure in appendix 1). Hence we proceeded to a sensitivity analysis on their value and we did not find them impacting the overall dynamic of the pathway (Lignet et al., 2013)..
The cellular and tissular model also involves a large number of parameters. A minority of them were fixed to values used in previous modelling works (Ribba et al., 2006a,b; Billy et al., 2009), the others were estimated to retrieve a tumour growth that qualitatively agrees with our previous works. Since the structure of the model is significantly different from the structure of these works, we had to modify the value of some of the extracted parameters. In the end, only the number of endothelial cells leading to the maturation, τ_E and the threshold of overcrowd τ_o are comparble to the values used in Ribba et al. (2006a). The Table 2 summarizes the values of each parameter. Due to the high computational cost of every simulation, it was impossible to proceed to a sensitivity analysis to investigate the importance of each parameter. But it appeared clearly during the manual fixing of the values that some parameters were more influential than others. In particular K, the diffusion coefficient for molecules in the tissue, $\alpha_{[V]}$ the production rate of VEGF, $\tau_{1,h}$ and $\tau_{2,h}$ the thresholds of hypoxia, τ_E the amount of cells necessary for endothelial cells to maturate, and τ_v the amount to create an efficient vessel, impact deeply on the dynamic of the system when their values were modified.
To give more confidence on our results, we have compared the resulting simulations to experimental data performed on mice experiments. As the focus of the present paper is the presentation of the model and not the experimental data, we decided not to detail our experimental protocol to shorten the presentation of the paper. The reader can have the details of a similar experimental study in Ribba et al. (2011).

3. Results

3.1. Tumour growth and effect of the antiangiogenic drug on the tumour vasculature

We simulated the model of tumour growth (without any treatment) by fixing the model parameters to pre-existing values (Ribba et al., 2006a,b; Billy et al., 2009). We represented in Figure 3 left panel the simulated evolution of the number of tumour cells together with real data of tumour volume over time in days in xenografted nude mice that received subcutaneously an injection of colorectal cancer cells. We assumed here that the total number of tumour cells is proportional to the tumour volume. Interestingly, the simulated curve present two regions of linear growth. A first transient region where the different biological regulation mechanisms starts, and that could correspond to the avascular stage of the tumour growth process. This phase is followed by a second regimen, corresponding to the vascular stage, when the tumour grows faster. This second stage growth is in good agreement with experimental measurements.

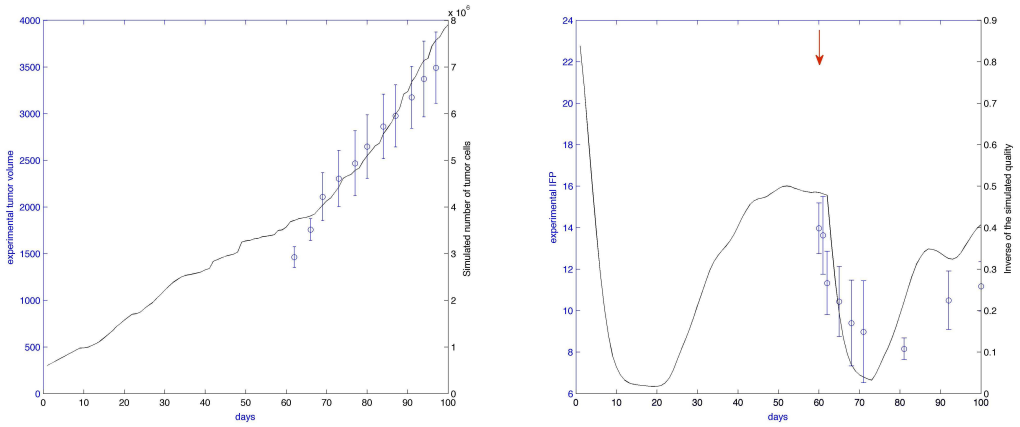

Figure 3: Left: Growth of the tumour in the absence of treatment. The solid line represents the simulated data while the dots and errors bars are the tumour volumes as measured experimentally in 27 nude mice. Right: Vasculature quality with 10 days of treatment of sunitinib, a potential antiangiogenic inhibitor. The solid line represents the inverse of the simulated vasculature quality index while the dots and errors bars represent the actual interstitial fluid pressure (IFP) measurements. The vertical arrow indicates the time of treatment initiation.

The new defined index of vasculature quality is also compared Figure 3 right panel to the real measurements of interstitial fluid pressure (IFP) within the tumour. IFP was measured by using an adequate probe within the tumour mass of the mice at repeated time. As the IFP increases, the pressure increases, resulting in a poorer quality of the blood flow within the tumour. As a consequence, to be in accordance with the real data, we plotted the time profile of the inverse of the vasculature quality index. Again, we find a very good agreement between simulations and observed data.

3.2. Effect of the cytotoxic drug on tumour size

As simulated by the model, the delivery of a dose of cytotoxics slows down the tumour growth by causing the death of proliferative cells (see Figure 5). This corresponds to a TEI of about 5 days. This results is also in agreement with TEI observed in xenografted mice treated with 45 mg/kg of Irinotecan (see Figure 6 of Simeoni et al. (2004)).

3.3. Combination of antiangiogenic and cytotoxics

To investigate the best strategy to deliver the two drugs in combination, we performed simulations where the antiangiogenic was always given at the same time whereas the cytotoxics was delivered some time after the antiangiogenic. We ran 30 simulations with the starting day of the cytotoxic delivery varying from 1 to 30 days after the beginning of the antiangiogenic at day 60. For each combination, we evaluated the two efficacy criteria described in the previous section : the time efficacy index (TEI) and the total amount of chemotherapy delivered to the tumour.

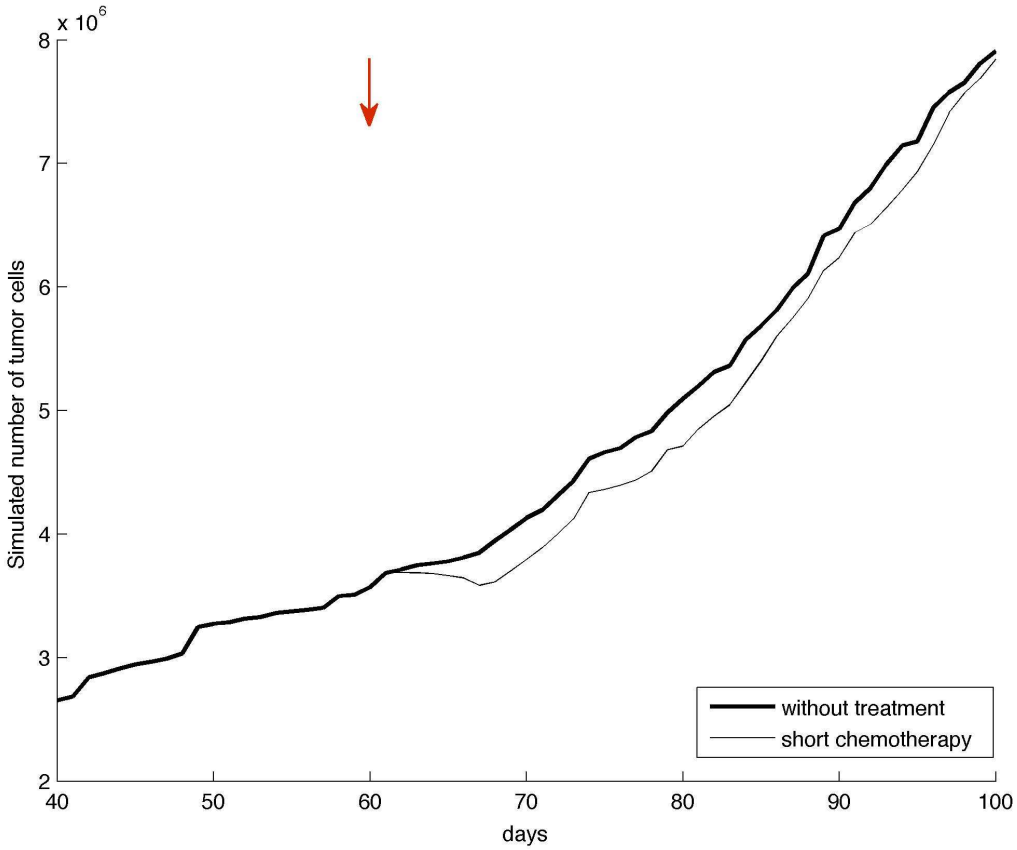

Figure 4: Simulated effect of chemotherapy. The thick line represented the control tumour growth while the thin line represents tumour size when a chemotherapy treatment is applied at day 60. The treatment induced a time efficacy index (TEI) of about 5 days as reported in literature for xenografted nude mice treated with bolus of 45 mg/Kg of Irinotecan, a chemotherapeutic compound. The vertical arrow indicates the time of treatment initiation.

Considering the time efficacy index (TEI) criteria, it was clear from Figure 4 that the chemotherapy alone induce a moderated TEI of few days. Combination with the antiangiogenic drug gives interesting results lengthening the TEI to approximately twice of its value for chemotherapy alone (about 8 to 10 days) when the chemotherapy is applied 5 to 10 days after the antiangiogenic (see Figure 6 - left panel). This is explained by the fact that the total amount of chemotherapy delivered into the tissue is increased by the normalization process due to the application, a few

days before, of the antiangiogenic drug (see Figure 5 - right panel). Interestingly, as shown on the left panel, the combination can also be deleterious before and after the normalization window illustrated by a negative TEI, i.e. the tumour grows faster in the individuals treated by the combination than in the individuals treated by chemotherapy alone. This can be explained by the fact that, despite improvement in the total amount of chemotherapy delivered into the tumour, cancer cells also benefits from good quality of oxygen and nutrient supply. In this respect, the model simulations highlight that there exists a critical equilibrium to be found between the blood or nutrient supply and the delivered chemotherapy agent; both being improved by the normalization process due to the effect of the antiangiogenic drug. In the model, these two aspects increase the effect of the chemotherapy since the improvement of the blood vessels improves the delivery of the oxygen, and so a decrease of the global hypoxia. Quiescent tumours cells can reintegrate the cell cycle and enter the P_2 phase, and this way become targets of the chemotherapy. The proportion of tumour cells potentially killed is then greatly increased and the effect of the chemotherapy is optimal.

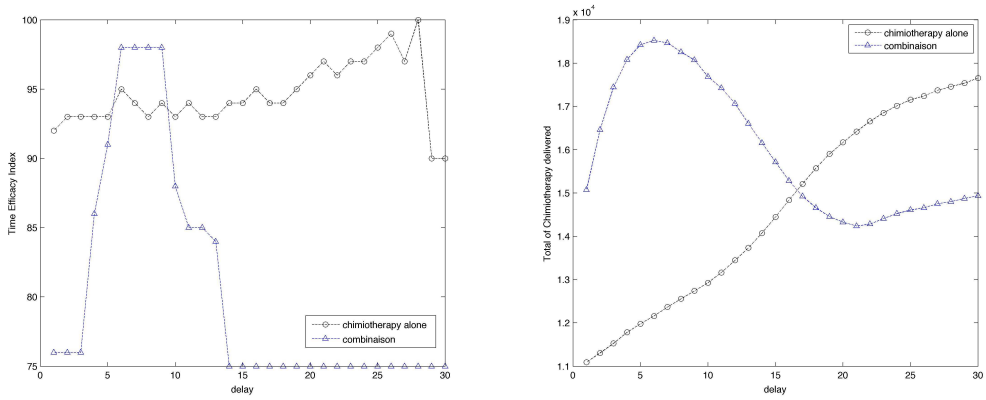

Figure 5: Efficacy results in terms of the two criteria (time efficacy index - left, and total amount of chemotherapy delivered - right) for different drug combination schedules. Circles are used for chemotherapy alone and triangles for combination therapies. The x-axis shows the delay in days of the chemotherapeutic compound delivery following the antiangiogenic drug.

4. Conclusions

In this work, we discuss the application of a multiscale model of vascular tumour growth to analyze the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy. The model being highly mechanistic and complex, parameters were not estimated but fixed based on literature and a-priori knowledge. In this model, tissue and cellular dynamics were coupled to describe tumour growth and the process of angiogenesis. The integration of the intracellular pathways of VEGF signalling together with the modelling of an index of vasculature quality as a function of the antiangiogenic treatment were the two main innovations that allowed us to analyze the efficacy of antiangiogenic drugs combined to cytotoxics.

We show that the model is able to qualitatively reproduce time-evolution of tumour volume in the absence of a treatment (unperturbed growth) and with a chemotherapy treatment, Irinotecan, in subcutaneous xenografted with colorectal cancer cell lines. The model also predicts well

the change of time-evolution of the interstitial fluid pressure, an index of vasculature quality, in the mice treated with a 12 days administration of the potent antiangiogenic inhibitor sunitinib. According to the model formulation, and as also hypothesized in literature (Jain, 2005), the efficacy of combining antiangiogenic with chemotherapy is linked to the normalization process of the tumour vasculature induced by the administration of the antiangiogenic drug. The consequence of this normalization may drive two major phenomena:

- the improvement, at the tissue level, of the chemotherapy delivery
- the improvement of the oxygen and nutrient supply to tumour cells

This last point may result in decreasing the hypoxic and quiescent rate of proliferative cells and thus increasing proliferation activity of the tumour; but also in raising the proportion of tumour cells targets of the chemotherapy drug. In consequence, finding the best schedule of administration between antiangiogenic and chemotherapy consists of finding the right balance between these two processes, i.e. tumour re-oxygenation and improved chemotherapy delivery.

Our simulations show that the chemotherapy compound must be administered 5 to 10 days after the antiangiogenic. Obviously, this result must be tested and eventually validated by a dedicated experimental study.

Technically, some of our choices can be discussed. Among them:

- We modelled the dynamics of the signalling pathways of VEGF with a set of ODEs. We could have used a simple set of dose-effect equations as the underlying complexity of the network was not fully used in our further analysis. We have decided to keep this level of complexity as it may offer, in a future, some possibilities to test the model with different time-protocols of various antiangiogenic coupounds targeting different levels in the VEGF signalling cascade.
- At the tissue level, we chose to consider that the volume occupied by endothelial cells is negligible compared to the volume of tumour and healthy cells. This hypothesis, which allows us to compute the velocity in the eq. (19) by considering that the volume occupied by healthy and tumour cells is constant (eq. (17)), can be debatable even if it can be considered that vessels represent a very small fraction of space compared to healthy tissue.
- We chose not to take into account the effect of the cytotoxic treatment on endothelial cells as well as the potential cytotoxic effect of the antiangiogenic drug. It would be interesting to quantify these respective cytotoxic effects and then consider that their association leads to an additive interaction as described by Loewe (see Greco et al. (1995) for details). On the other hand, in the context of metronomic chemotherapies, the cytotoxic treatment may have an antiangiogenic effect (Browder et al., 2000; Klement et al., 2000), which we also negleted here.
- In the model, we only considered growth factors released by quiescent tumour cells, such as VEGF, but did not include the effect of endogenous inhibitors of angiogenesis such as endostatin, angiostatin and thrombospondin-1 (O'Reilly et al., 1994, 1997)

- The model includes a large number of parameters. A part of them cannot yet be measured experimentally. Their values would have to be set by mathematical estimations techniques, from the few experimental data available. Nevertheless, some parameters are experimentally accessible, such as the concentration of oxygen in the blood, the proliferation rates of endothelial and tumour cells, or the diffusion speed of oxygen and VEGF in the tissue. So with the current progresses in experimental biology, we can hope to be able to parametrize the model in a more precise way to fit to a particular setting.

Compared to classical models, mechanistic-based multiscale models of tumour growth and treatment, as the one we present here, open a different but complementary paradigm, with, as a major pitfall, a more limited application potential due to the large number of parameters they integrate. However, it is believed that the development of multiscale models can provide the basis for an integrative holistic approach to predict drug response and effect (Bonate and Howard, 2011). Our model could constitute a first step towards the development of a modelling tool to optimize antiangiogenic drug in combination with chemotherapy in preclinical settings. This complex physiologically-based model could be used to scale up results obtained in animal experiments to the use of these drugs to treat cancer patients. Indeed, the complexity introduced in the model, with the detailed description of the tumour characteristic and quality vasculature changing as a function of the drug protocol, would hopefully help the translation from preclinical to clinical study by relying on tumour-specific parameters, such as as the tumour doubling time for example. These translational aspects constitute a very exciting challenge we would like to address in a near future.

5. Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Branka Cayavec-Bernard for her valuable advices.

Entity	Model equation
Density of P1	$\frac{\partial P_1}{\partial t} + \frac{\partial P_1}{\partial a} + \nabla \cdot (\mathbf{v_{P_1}} P_1) = 0 \qquad P_1(a=0) = 2P_2(a = a_{max,P_2})$
Density of P2	$\frac{\partial P_2}{\partial t} + \frac{\partial P_2}{\partial a} + \nabla \cdot (\mathbf{v_{P_2}} P_2) = -P_2(a = a_{max,P_2}) \frac{E_{max,C}\,[C]}{C_{50}+[C]} \qquad P_2(a=0) = f P_1(a = a_{max,P_1}) + [\partial_t f]^+ Q(t^-)$
Density of Q	$\frac{\partial Q}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v_Q} Q) = g(1-f) P_1(a = a_{max,P_1}) - \left[\frac{\partial f}{\partial t}\right]^+ Q(t^-) + \left[\frac{\partial g}{\partial t}\right]^- Q(t^-)$
Density of A	$\frac{\partial A}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v_A} A) = (1-g) P_1(a = a_{max,P_1}) - \left[\frac{\partial g}{\partial t}\right]^- Q(t^-)$
Density of H	$\frac{\partial H}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v}_H H) = 0$
Density of mature vessel cells	$\frac{\partial\, Es}{\partial t} = \mu\, \mathcal{H}(E + Es - \tau_E)\, E - a_{ES}\, Es$
Density of immature vessel cells	$\frac{\partial\, E}{\partial t} + \nabla \cdot (\chi\, E\, (1 - \frac{E}{N_E}) \nabla [V]) \;=\; p\, E(1 - \frac{E+Es}{N_E}) - a_E\, E - \mu\, \mathcal{H}(E + Es - \tau_E)\, E$
Quality of the vasculature	$R = \frac{\int E}{Vol} \qquad \Pi = 1 - \frac{R^{\gamma n}}{R^{\gamma n} + R_{0.5}^{\gamma n}},$
Concentration of Oxygen	$-\nabla (K_{[O_2]} \nabla [O_2]) = -\sum_\phi \alpha_{[O_2],\phi} \phi \qquad [O_2] = \Pi C_{max}$ where $Es \geq \tau_v$
Concentration of VEGF	$\frac{\partial\, [V]}{\partial t} - \nabla \cdot (K_{[V]}\, \nabla [V]) \;=\; \alpha_{[V]}\, Q_{[0_2] \leq \tau_{1,h}} - \beta_{[V]}\, E[V] - \delta_{[V]}\, [V] - [V]\, \frac{Emax_{[AA]}\, [AA]}{[AA]_{50} + [AA]}$
Concentration of chemo.	$-\nabla \cdot (K \nabla [C]) = -\xi_{[C]}\, [C] \qquad [C] = \Pi\, P_{[C]}(t)$ where $Es \geq \tau_v$
Concentration of antiangiogenic	$-\nabla \cdot (K \nabla [AA]) = -[V]\, \frac{Emax_{[AA]}\, [AA]}{v_{50} + [AA]} \qquad [AA] = \Pi\, P_{[AA]}(t)$ where $Es \geq \tau_v$

Table 1: **Macroscopic model equations.** Notations : P1 and P2 are proliferative, Q quiescent, and A apoptotic tumour cells; endothelial cells are endothelial cells; Vim and Vm are respectively immature and mature vessels ; Ang1 and Ang2 are angiopoietins 1 and 2; VEGF is vascular endothelial growth factor; chemo stands for chemotherapy and antiangiogenic for anti-angiogenics.

Parameter	Description	Value	Unit	Equation
τ_0	Threshold of overcrowding	$5 \cdot 10^4$	cell	(8)
$\tau_{1,h}$	Threshold of moderate hypoxia	$4 \cdot 10^{-7}$	M	(8)
$\tau_{2,h}$	Threshold of severe hypoxia	$4 \cdot 10^{-9}$	M	(9)
N_{max}	Total density of tumour and/or healthy cells	10^5	cell	(17)
$a_{max,P1}$	Maximum duration of phase P1	5	time-unit	(10), (14), (17)
$a_{max,P2}$	Maximum duration of phase P2	8	time-unit	(10), (14), (17)
$\alpha_{[V]}$	Secretion rate of VEGF by quiescent cells	10^{-8}	M/cell	(20)
$\delta_{[V]}$	Consumption rate of VEGF by immature endothelial cells	0	M/cell	(20)
$\xi_{[V]}$	Degradation rate of VEGF	0	M^{-1}	(20)
N_E	Maximum number of endothelial cells	10^5	cell	(6)
μ	Rate of maturation for endothelial cells	0.5	cell/time-unit	(6)
τ_E	Minimim quantity of immature EC leading to maturation	$5 \cdot 10^2$	cell	(6)
γ_n	Sigmoidal coefficient for the computation of vasculature quality	0.5	cell/mm2	(2)
$R_{0.5}$	Density of EC leading to half of the maximal vasculature quality	$8 \cdot 10^{-3}$	cell/mm2	(2)
τ_v	Number of EC needed to form a functional blood vessl	$4 \cdot 10^4$	cell	(21),(20),(24),(22)
C_{max}	Oxygen concentration in blood	2.10^{-2}	M	(21)
K	Diffusion coefficient of molecules in the tissue	1 to 5	mm2/time-unit	(21),(20),(22),(24)
$\beta_{[O_2],P_1}$	Oxygen consumption of the P_1 tumour cells	10^{-4}	M/cell	(21)
$\beta_{[O_2],P_2}$	Oxygen consumption of the P_2 tumour cells	10^{-4}	M/cell	(21)
$\beta_{[O_2],Q}$	Oxygen consumption of the quiescent tumour cells	$0.25 \cdot 10^{-4}$	M/cell	(21)
$\xi_{[C]}$	Degradation rate of chemotherapy	$1.25 \cdot 10^{-4}$	M/time-unit	(22)
$Emax_{[AA]}$	Maximal effect of the antiangiogenic drug on VEGF	1	none	(24), (25)
v_{50}	Amount of antiangiogenic drug producing half of the maximal effect	0.5	M	(24),(25)
$E_{max,C}$	Maximal effect of the chemotherapy on P_2 cells	0.75	none	(23)
C_{50}	Amount of chemotherapy producing half of the maximal effect	0.2	M	(23)

Table 2: Summary of the model parameters

AppendixA. Simulation techniques

AppendixA.1. Initial conditions

To initiate the model, we place in a grid a circular tumour formed mainly of P1 and P2 proliferative cells and a small part of quiescent cells. Then we randomly place endothelial cells in the tumour area, mainly to form mature vessels and a small fraction for immature vessels. Depending on the density of cells over the domain, we compute the diffusion coefficient for VEGF, oxygen, cytotoxic and antiangiogenic drugs. We compute the diffusion of VEGF secreted by the endothelial cells. From the distribution of VEGF, we calculate the values of angiogenesis parameters with the molecular model. Then, we evaluate the quality of the vasculature depending on the distribution of immature vessels. This permits us to simulate the delivery of oxygen by the vasculature. Once all the variables of the system are initialized,we can simulate the cell cycle.

AppendixA.2. Cellular loop

The simulation is based on a recursive loop with a time unit which corresponds to the passage of tumour cells from one age to the next. Computations are performed using a splitting technique. At each step, we first compute the passage of the cells in age, depending on the environmental conditions (oxygen and local density of cells) of the previous step. We can extract the variation in mass due to proliferation $P_2(a = a_{max,P_2})$. We retrieve the pressure by solving the equation (19) and the velocity is computed using the Darcy's Law presented in eq. (15). The pure transport part is solved using a upwind-scheme, corresponding to the equation :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{v}_\phi \phi) = 0, \tag{A.1}$$

with suitable sub time units in order to respect stability conditions. Finally, the expansion part due to non-zero divergence of the velocity field is computed.

Then we compute the proliferation and the migration of the endothelial cells depending on the local amount of cells, VEGF repartition and the angiogenesis parameters describing proliferation, migration and apoptosis rate taken at the equilibrium and all computed at the previous step. The computational technique used is similar to the one used to compute the dynamics of tumour cells.
The diffusion equations (pressure, VEGF, Oxygen, drugs) are solved using a finite-volume scheme. A penalization method is used to deal with the complex boundary conditions appearing in the equation for the oxygen and the drugs, transforming it into a penalized right-hand side.
From the distribution of VEGF, we retrieve the angiogenesis parameters at each location, at the steady state of the molecular model.
To save computation time, we calculate *a priori* a base of values of angiogenesis parameters for a large and small-discretized range of possible VEGF values. At each time unit, angiogenesis parameters are extracted from this base, depending on the local amount of VEGF. But our model also allows a simultaneous computation of these parameters for a precise quantity of angiogenic factor.

AppendixB. Molecular model

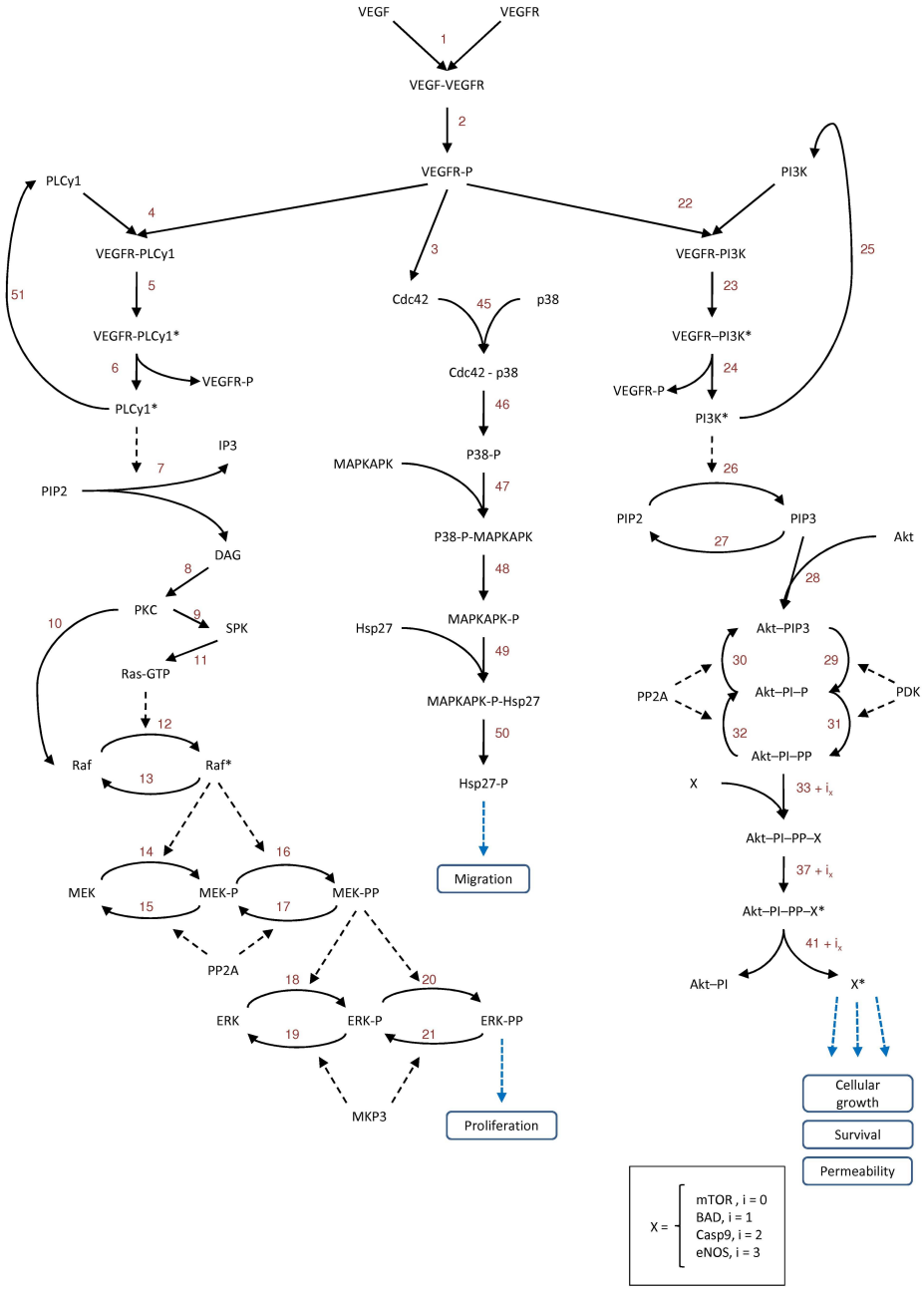

Figure B.6: Complete schematic representation of the molecular pathways of VEGF signalling.

AppendixC. Equations of the molecular model

Reaction	Rate equation
v_1	$k_1\,[VEGF]\,[VEGFR] - km_1\,[VEGF.VEGFR]$
v_2	$k_2\,[VEGF.VEGFR]^2 - km_2\,[VEGF.VEGFR2]$
v_3	$k_3\,[VEGF.VEGFR2] - km_3\,[VEGF.VEGFR2P]$
v_4	$k_4\,[VEGF.VEGFR2P]\,[PLC\gamma] - km_4\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma s]$
v_5	$k_5\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma] - km_5[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P]$
v_6	$k_6\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P] - km_6\,[PLC\gamma P]\,[VEGF.VEGFR2P]$
v_7	$k_7\,[PLC\gamma P][PKC] - km_7\,[PKC*]$
v_8	$V_8\,[PKC*]\,[RasGDP]/(K_8 + [RasGDP])$
v_9	$V_9\,[RasGTP]/(K_9 + [RasGTP])$
v_{10}	$V_{10}\,[RasGTP][Raf]/(K_{10} + [Raf])$
v_{11}	$V_{11}\,(Akt.PI.PP + Enz)\,[RafP]/(K_{11} + [RafP])$
v_{12}	$V_{12}\,[RafP][MEK]/(K_{12}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{14}}) + [MEK])$
v_{13}	$V_{13}\,[PP2A][MEKP]/(K_{13}\,(1 + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[Akt.PI.P]}{K_{30}} + \frac{[Akt.PI.PP]}{K_{32}}) + [MEKP])$
v_{14}	$V_{14}\,[RafP][MEKP]/(K_{14}\,(1 + \frac{[MEK]}{K_{12}}) + [MEKP])$
v_{15}	$V_{15}\,[PP2A][MEKPP]/(K_{15}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{13}} + \frac{[Akt.PI.P]}{K_{30}} + \frac{[Akt.PI.PP]}{K_{32}}) + [MEKPP])$
v_{16}	$V_{16}\,[MEKPP]\,[ERK]/(K_{16}\,(1 + \frac{[ERKP]}{K_{18}}) + [ERK])$
v_{17}	$V_{17}\,[MKP3]\,[ERKP]/(K_{17}\,(1 + \frac{[ERKPP]}{K_{19}}) + [ERKP])$
v_{18}	$V_{18}\,[MEKPP]\,[ERKP]/(K_{18}\,(1 + \frac{[ERK]}{K_{16}}) + [ERKP])$
v_{19}	$V_{19}\,[MKP3]\,[ERKPP]/(K_{19}\,(1 + \frac{[ERKP]}{K_{17}}) + [ERKPP])$
v_{20}	$V_{20}\,[PLC\gamma P]/(K_{20} + [PLC\gamma P])$
v_{21}	$V_{21}\,[VEGF.VEGFR2P]/(K_{21} + [VEGF.VEGFR2P])$
v_{22}	$k_{22}\,[PI3K]\,[VEGF.VEGFR2P] - km_{22}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K]$
v_{23}	$k_{23}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K] - km_{23}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K*]$
v_{24}	$k_{24}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K*] - km_{24}\,[VEGF.VEGFR2P]\,[PI3K*]$
v_{25}	$V_{25}\,[PI3K*]/(K_{25} + [PI3K*])$
v_{26}	$V_{26}\,[PI3K*]\,[PIP2]/(K_{26} + [PIP2])$
v_{27}	$V_{27}\,[PIP3]/(K_{27} + [PIP3])$
v_{28}	$k_{28}\,[PIP3]\,[Akt] - km_{28}[Akt.PIP3]$
v_{29}	$V_{29}\,[PDK]\,[Akt.PIP3]/(K_{29}\,(1 + \frac{[Akt.PI.P]}{K_{31}}) + [Akt.PIP3])$
v_{30}	$V_{30}\,[PP2A]\,[Akt.PI.P]/(K_{30}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{13}} + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[Akt.PI.PP]}{K_{32}}) + [Akt.PI.P])$
v_{31}	$V_{31}\,[PDK]\,[Akt.PI.P]/(K_{31}\,(1 + \frac{[Akt.PIP3]}{K_{29}}) + [Akt.PI.P])$
v_{32}	$V_{32}\,[PP2A]\,[Akt.PI.PP]/(K_{32}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{13}} + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[Akt.PI.P]}{K_{30}}) + [Akt.PI.PP])$
v_{33}	$k_{33}\,[Akt.PI.PP]\,[Casp9] - km_{33}\,[Casp9P]$
v_{34}	$V_{34}\,[VEGF.VEGFR2P][P38]/(K_{34} + [P38])$
v_{35}	$V_{35}\,[P38P]/(K_{35} + [P38P])$
v_{36}	$V_{36}\,[P38P][MAPKAPK]/(K_{36} + [MAPKAPK])$
v_{37}	$V_{37}\,[MAPKAPK.P]/(K_{37} + [MAPKAPK.P])$
v_{38}	$V_{38}\,[MAPKAPK.P][Hsp27]/(K_{38} + [Hsp27])$
v_{39}	$V_{39}\,[Hsp27.P]/(K_{39} + [Hsp27.P])$
$ERK.PP \rightarrow$ proliferation(p)	$\frac{k52*ERK_P P^g}{km52^g + ERK_P P^g}$
$CASP.P \rightarrow$ apoptosis resistance(a)	$k53 * \frac{km53^g}{km53^g + CASP.P^g}$
$HSP27.P \rightarrow$ migration(χ)	$k54 * \frac{Hsp27.P^g}{km54^g + Hsp27.P^g}$

Table C.3: Reactions and rate equations of the model.

Molecule	Differential equation
$VEGF$	$-v_1$
$VEGFR$	$-v_1$
$VEGF.VEGFR$	$v_1 - 2 * v_2$
$VEGF.VEGFR2$	$v_2 - v_3$
$VEGF.VEGFR2P$	$v_3 - v_4 + v_6 - v_{21} - v_{22} + v_{24}$
PLC_γ	$-v_4 + v_{20}$
$VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma$	$v_4 - v_5$
$VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P$	$v_5 - v_6$
$PLC_\gamma P$	$v_6 - v_7 - v_{20}$
PKC	$-v_7$
$PKC*$	v_7
$RasGDP$	$-v_8 + v_9$
$RasGTP$	$v_8 - v_9$
Raf	$-v_{10} + v_{11}$
$RafP$	$v_{10} - v_{11}$
MEK	$-v_{12} + v_{13}$
$MEKP$	$v_{12} - v_{13} - v_{14} + v_{15}$
$MEKPP$	$v_{14} - v_{15}$
ERK	$-v_{16} + v_{17}$
$ERKP$	$v_{16} - v_{17} - v_{18} + v_{19}$
$ERKPP$	$v_{18} - v_{19}$
$PI3K$	$-v_{22} + v_{25}$
$VEGF.VEGFR2P.PI3K$	$v_{22} - v_{23}$
$VEGF.VEGFR2P.PI3K*$	$v_{23} - v_{24}$
$PI3K*$	$v_{24} - v_{25}$
$PIP2$	$-v_{26} + v_{27}$
$PIP3$	$v_{26} - v_{27} - v_{28}$
Akt	$-v_{28}$
$Akt.PIP3$	$v_{28} - v_{29} + v_{30}$
$Akt.PI.P$	$v_{29} - v_{30} - v_{31} + v_{32}$
$Akt.PI.PP$	$v_{31} - v_{32} - v_{33}$
$Casp9$	$-v_{33}$
$Casp9P$	v_{33}
$P38$	$-v_{34} + v_{35}$
$P38P$	$v_{34} - v_{35}$
$MAPKAPK$	$-v_{36} + v_{37}$
$MAPKAPKP$	$v_{36} - v_{37}$
$Hsp27$	$-v_{38} + v_{39}$
$HSP27P$	$v_{38} - v_{39}$

Table C.4: List of all molecules and corresponding equations

AppendixD. Parameters of the molecular model

Parameter	Value	Source	Parameter	Value	Source
k_1	0.0012	Hatakeyama et al. (2003)	km_1	0.00076	Hatakeyama et al. (2003)
k_2	0.01	Hatakeyama et al. (2003)	km_2	1	Hatakeyama et al. (2003)
k_3	1	Hatakeyama et al. (2003)	km_3	0.01	Hatakeyama et al. (2003)
k_4	0.06	Wang et al. (2007)	km_4	0.2	Wang et al. (2007)
k_5	1	Wang et al. (2007)	km_5	0.05	Wang et al. (2007)
k_6	0.3	Wang et al. (2007)	km_6	0.006	Wang et al. (2007)
k_7	0.214	Wang et al. (2007)	km_7	5.35	Wang et al. (2007)
V_8	0.222	Hatakeyama et al. (2003)	K_8	0.181	Hatakeyama et al. (2003)
V_9	0.289	Hatakeyama et al. (2003)	K_9	0.0571	Hatakeyama et al. (2003)
V_{10}	1.53	Hatakeyama et al. (2003)	K_{10}	11.7	Hatakeyama et al. (2003)
V_{11}	0.00673	Hatakeyama et al. (2003)	K_{11}	8.07	Hatakeyama et al. (2003)
V_{12}	3.5	Hatakeyama et al. (2003)	K_{12}	317	Hatakeyama et al. (2003)
V_{13}	0.058	Hatakeyama et al. (2003)	K_{13}	2200	Hatakeyama et al. (2003)
V_{14}	2.9	Hatakeyama et al. (2003)	K_{14}	317	Hatakeyama et al. (2003)
V_{15}	0.058	Hatakeyama et al. (2003)	K_{15}	60	Hatakeyama et al. (2003)
V_{16}	9.5	Hatakeyama et al. (2003)	K_{16}	146000	Hatakeyama et al. (2003)
V_{17}	0.3	Hatakeyama et al. (2003)	K_{17}	160	Hatakeyama et al. (2003)
V_{18}	16	Hatakeyama et al. (2003)	K_{18}	146000	Hatakeyama et al. (2003)
V_{19}	0.27	Hatakeyama et al. (2003)	K_{19}	60	Hatakeyama et al. (2003)
V_{20}	1	Wang et al. (2007)	K_{20}	100	Wang et al. (2007)
V_{21}	6	Est	K_{21}	50	Est.
k_{22}	0.1	Hatakeyama et al. (2003)	km_{22}	2	Hatakeyama et al. (2003)
k_{23}	9.85	Hatakeyama et al. (2003)	km_{23}	0.0985	Hatakeyama et al. (2003)
k_{24}	45.8	Hatakeyama et al. (2003)	km_{24}	0.047	Hatakeyama et al. (2003)
V_{25}	2620	Hatakeyama et al. (2003)	K_{25}	3680	Hatakeyama et al. (2003)
V_{26}	16.9	Hatakeyama et al. (2003)	K_{26}	39.1	Hatakeyama et al. (2003)
V_{27}	17000	Hatakeyama et al. (2003)	K_{27}	9.02	Hatakeyama et al. (2003)
k_{28}	507	Hatakeyama et al. (2003)	km_{28}	234	Hatakeyama et al. (2003)
V_{29}	20000	Hatakeyama et al. (2003)	K_{29}	80000	Hatakeyama et al. (2003)
V_{30}	0.107	Hatakeyama et al. (2003)	K_{30}	4.35	Hatakeyama et al. (2003)
V_{31}	20000	Hatakeyama et al. (2003)	K_{31}	80000	Hatakeyama et al. (2003)
V_{32}	0.211	Hatakeyama et al. (2003)	K_{32}	12	Hatakeyama et al. (2003)
k_{33}	1	Est.	km_{33}	0.1	Est.
V_{34}	0.1	Est.	K_{34}	20	Est.
V_{35}	1	Est.	K_{35}	50	Est.
V_{36}	0.1	Est.	K_{36}	5	Est.
V_{37}	1	Est.	K_{37}	0.01	Est.
V_{38}	10	Est.	K_{38}	10	Est.
V_{39}	1	Est.	K_{39}	10	Est.
PDK	1	Hatakeyama et al. (2003)	$PP2A$	11.4	Hatakeyama et al. (2003)
$MKP3$	2.4	Hatakeyama et al. (2003)	Enz	7	Hatakeyama et al. (2003)

Table D.5: Molecular model parameters. Michaelis-Menten constants ($K_8 \rightarrow K_{21}$, K_{25}, K_{26}, K_{27}, $K_{29} \rightarrow K_{32}$, $K_{34} \rightarrow K_{39}$) are given in nM. $V_8 \rightarrow V_{21}$, V_{25}, V_{26}, V_{27}, $V_{29} \rightarrow V_{32}$, $V_{34} \rightarrow V_{39}$ are expressed in $nM.s^{-1}$. First- and second-order rate constants are given in s^{-1} and $nM^{-1}.s^{-1}$ respectively. The bottom of the table presents the constant concentrations of the enzymes, in nM.

Ambrosi, D., Preziosi, L., 2002. On the closure of mass balance models for tumor growth. Mathematical Models and Methods in Applied Sciences 12 (5), 737.

Anderson, A., Chaplain, M., 1998. Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. Bulletin of Mathematical Biology 60 (5), 857–899.

Bartha, K., Rieger, H., 2006. Vascular network remodeling via vessel cooption, regression and growth in tumors. Journal of Theoretical Biology 241 (4), 903–918.

Billy, F., Ribba, B., Saut, O., Morre-Trouilhet, H., Colin, T., Bresch, D., Boissel, J., Grenier, E., Flandrois, J., 2009. A pharmacologically based multiscale mathematical model of angiogenesis and its use in investigating the efficacy of a new cancer treatment strategy. Journal of Theoretical Biology 260 (4), 545–562.

Bonate, P., Howard, D., 2011. Pharmacokinetics in drug development: advances and applications. Vol. 3. Springer.

Browder, T., Butterfield, C., Kräling, B., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M., Folkman, J., 2000. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. Cancer research 60 (7), 1878.

Byrne, H., Chaplain, M., 1995. Growth of nonnecrotic tumors in the presence and absence of inhibitors. Mathematical Biosciences 130 (2), 151–181.

Claret, L., Girard, P., Hoff, P., Van Cutsem, E., Zuideveld, K., Jorga, K., Fagerberg, J., Bruno, R., 2009. Model-based prediction of phase iii overall survival in colorectal cancer on the basis of phase ii tumor dynamics. Journal of Clinical Oncology 27 (25), 4103–4108.

Czabanka, M., Vinci, M., Heppner, F., Ullrich, A., Vajkoczy, P., 2009. Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. International Journal of Cancer 124 (6), 1293–1300.

Dickson, P., Hamner, J., Sims, T., Fraga, C., Ng, C., Rajasekeran, S., Hagedorn, N., McCarville, M., Stewart, C., Davidoff, A., 2007. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. Clinical Cancer Research 13 (13), 3942–3950.

d'Onofrio, A., Gandolfi, A., 2004. Tumour eradication by antiangiogenic therapy: analysis and extensions of the model by hahnfeldt et al.(1999). Mathematical Biosciences 191 (2), 159–184.

Folkman, J., 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Vol. 29. Elsevier.

Gasparini, G., Longo, R., Fanelli, M., Teicher, B., 2005. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. Journal of Clinical Oncology 23 (6), 1295.

Greco, W., Bravo, G., Parsons, J., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. Pharmacological Reviews 47 (2), 331.

Greenspan, H., 1972. Models for the growth of a solid tumor by diffusion. Studies in Applied Mathematics 51 (4), 317–340.

Hahnfeldt, P., Panigrahy, D., Folkman, J., Hlatky, L., 1999. Tumor development under angiogenic signaling. Cancer Research 59 (19), 4770.

Hatakeyama, M., Kimura, S., Naka, T., Kawasaki, T., Yumoto, N., Ichikawa, M., Kim, J., Saito, K., Saeki, M., Shirouzu, M., et al., 2003. A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling. Biochemical Journal 373 (Pt 2), 451.

He, K., Jin, K., Wang, H., Teng, L., 2012. Anti-angiogenic therapy for colorectal cancer: On the way to getting better! Hepato Gastroenterology-Current Medical and Surgical Trends 59 (116), 1113.

Hendriks, B., Hua, F., Chabot, J., 2008. Analysis of mechanistic pathway models in drug discovery: p38 pathway. Biotechnology Progress 24 (1), 96–109.

Hochster, H., Hart, L., Ramanathan, R., Childs, B., Hainsworth, J., Cohn, A., Wong, L., Fehrenbacher, L., Abubakr, Y., Saif, M., et al., 2008. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the tree study. Journal of Clinical Oncology 26 (21), 3523–3529.

Jain, R., 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. Nature Medicine 7 (9), 987–989.

Jain, R., 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science 307 (5706), 58.

Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D., Bohlen, P., Kerbel, R., 2000. Continuous low-dose therapy with vinblastine and vegf receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. Journal of Clinical Investigation 105 (8), R15.

Kohandel, M., Kardar, M., Milosevic, M., Sivaloganathan, S., 2007. Dynamics of tumor growth and combination of anti-angiogenic and cytotoxic therapies. Physics in Medicine and Biology 52, 3665–3677.

Lee, D., Rieger, H., Bartha, K., 2006. Flow correlated percolation during vascular remodeling in growing tumors. Physical Review Letters 96 (5), 58104.

Lignet, F., Calvez, V., Grenier, E., Ribba, B., 2013. A structural model of the vegf signalling pathway : emergence of robustness and redundancy properties. Mathematical Biosciences and Engineering 10 (1), in press.

Ma, J., Li, S., Reed, K., Guo, P., Gallo, J., 2003. Pharmacodynamic-mediated effects of the angiogenesis inhibitor su5416 on the tumor disposition of temozolomide in subcutaneous and intracerebral glioma xenograft models. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 305 (3), 833–839.

Ma, J., Waxman, D., 2008. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. Molecular Cancer Therapeutics 7 (12), 3670.

Magni, P., Simeoni, M., Poggesi, I., Rocchetti, M., De Nicolao, G., 2006. A mathematical model to study the effects of drugs administration on tumor growth dynamics. Mathematical biosciences 200 (2), 127–151.

Mantzaris, N., Webb, S., Othmer, H., 2004. Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis. Journal of Mathematical Biology 49 (2), 111–187.

O'Reilly, M., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W., Flynn, E., Birkhead, J., Olsen, B., Folkman, J., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88 (2), 277–285.

O'Reilly, M., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R., Moses, M., Lane, W., Cao, Y., Sage, E., Folkman, J., 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. Cell 79 (2), 315–328.

Pouysségur, J., Dayan, F., Mazure, N., 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. Nature 441 (7092), 437–443.

Ribba, B., Colin, T., Schnell, S., 2006a. A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies. Theoretical Biology and Medical Modelling 3 (1), 7.

Ribba, B., et al, in press. A tumor growth inhibition model for low-grade glioma treated with chemotherapy of radiotherapy. Clininical Cancer Research.

Ribba, B., Saut, O., Colin, T., Bresch, D., Grenier, E., Boissel, J., 2006b. A multiscale mathematical model of avascular tumor growth to investigate the therapeutic benefit of anti-invasive agents. Journal of Theoretical Biology 243 (4), 532–541.

Ribba, B., Watkin, E., Tod, M., Girard, P., Grenier, E., You, B., Giraudo, E., Freyer, G., 2011. A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. European Journal of Cancer 47 (3), 479–490.

Ribba, B., You, B., Tod, M., Girard, P., Tranchand, B., Trillet-Lenoir, V., Freyer, G., 2009. Chemotherapy may be delivered based on an integrated view of tumour dynamics. IET Systems Biology 3, 180.

Rocchetti, M., Simeoni, M., Pesenti, E., De Nicolao, G., Poggesi, I., 2007. Predicting the active doses in humans from animal studies: a novel approach in oncology. European Journal of Cancer 43 (12), 1862–1868.

Scheithauer, W., Schmiegel, W., 2009. Bevacizumab plus oxaliplatin-based regimens for the treatment of colorectal cancer. Onkologie 32 (7), 431.

Simeoni, M., Magni, P., Cammia, C., De Nicolao, G., Croci, V., Pesenti, E., Germani, M., Poggesi, I., Rocchetti, M., 2004. Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. Cancer Research 64 (3), 1094.

Tong, R., Boucher, Y., Kozin, S., Winkler, F., Hicklin, D., Jain, R., 2004. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. Cancer research 64 (11), 3731.

Wang, Y., Sung, C., Dartois, C., Ramchandani, R., Booth, B., Rock, E., Gobburu, J., 2009. Elucidation of relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer patients can aid early decision making in clinical drug development. Clinical Pharmacology & Therapeutics 86 (2), 167–174.

Wang, Y., Zhang, L., Sagotsky, J., T.S., D., 2007. Simulating non-small cell lung cancer with a multiscale agent-based model. Theoretical Biology and Medical Modelling 4, 50.

Welter, M., Bartha, K., Rieger, H., 2008. Emergent vascular network inhomogeneities and resulting blood flow patterns in a growing tumor. Journal of Theoretical Biology 250 (2), 257–280.

Zheng, X., Wise, S., Cristini, V., 2005. Nonlinear simulation of tumor necrosis, neovascularization and tissue invasion via an adaptive finite-element/level-set method. Bulletin of Mathematical Biology 67 (2), 211–259.

Chapitre 4

Modèle continu des voies de signalisation moléculaire du VEGF, approche biologie systémique

4.1 Avant-propos

L'angiogénèse est un processus clé de la croissance tumorale, qui permet la mise en place d'un réseau vasculaire irriguant la tumeur et autorisant la dissémination de métastases dans l'organisme (Folkman, 2002). De nombreuses molécules sont impliquées dans ce processus, la principale étant le VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire). Même si cette molécule est identifiée comme clé dans l'invasion tumorale depuis de nombreuses années, peu de données quantitatives sont disponibles dans la littérature à propos de la dynamique des voies moléculaires que sa liaison avec ses récepteurs déclenche. Or cette molécule est visée par plusieurs efforts de développement de thérapies ciblées. On peut par exemple citer le bevacizumab (commercialisé sous le nom d'Avastin), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF testé avec succès en combinaison avec des thérapies cytotoxiques conventionnelles (Pickering et al., 2008). Parmi les inhibiteurs de la phosphorylation des sites à tyrosine-kinase des récepteurs du VEGF, le sunitinib (commercialisé sous le nom de Sutent), approuvé pour le traitement des cancers gastro-intestinaux et renaux, et le sorafenib (commercialisé sous le nom de Nexavar), approuvé pour le traitement des cancers du rein et du foie. Malgré des résultats prometteurs dans les premières phases du développement clinique, les essais de phase III de traitement par sunitinib de patients atteints de tumeurs mammaires, colorectales ou du

poumon, ont échoué. Par ailleurs des molécules sont développées pour cibler les voies moléculaires elles-mêmes, et pas seulement le complexe ligand-récepteur qui les active. L'everolimus et le temsirolimus (resp. commercialisés sous les noms Afinitor et Torisel) sont par exemple des inhibiteurs de mTor (messager intra-cellulaire impliqué principalement dans la survie cellulaire), utilisés pour le traitement de tumeurs rénales. Mais pour ces quelques molécules mises sur le marché, des centaines sont entrées en phase d'essai clinique pour être rejetées par manque d'efficacité dans les dernières phases.

Une meilleure connaissance des voies moléculaires visées pourrait être utile à la compréhension de ces échecs et pourrait permettre l'élaboration de nouvelles thérapies efficientes.

De nombreux formalismes existent pour la modélisation de voies de signalisation intracellulaires. On peut notamment citer les réseaux booléens, qui représentent le réseau moléculaire sous forme de graphe, et dans lesquels l'action des molécules est décrite de façon binaire, en terme d'activation et d'inactivation. Schlatter et al. (2009) ont ainsi décrit les voies moléculaires activant l'apoptose dans des hépatocytes. Les réseaux de Petri sont basés eux aussi sur des graphes, mais décrivent des transitions de quantités discrètes entre les places du réseau. Un tel formalisme a par exemple été utilisé pour modéliser le réseau de signalisation de l'interleukine 3 dans une cellule hematopoïétique (Matsuno et al., 2006). Mais le formalisme le plus couramment utilisé, parce qu'il permet une prise en compte de la stochiométrie des réactions, est la modélisation par un système d'EDOs représentant l'évolution de la quantité de chaque entité du système en fonction des vitesses des réactions la produisant et la synthétisant. Pour illustration, un très bon travail a été effectué par Schoeberl et al. (2002) pour la modélisation des voies de signalisation en aval du récepteur du facteur de croissance épidermique. Ce type de formalisme permet par ailleurs l'analyse de la dynamique des systèmes d'un point de vue mathématique, pour l'identification d'états d'équilibre, ou l'analyse de la robustesse du système. Alves et al. (2006) et Aldridge et al. (2006) proposent des méthodologies pour la construction et l'exploitation de ce type de modèle.

Par ailleurs, un langage dédié à la description de réseaux moléculaires est développé depuis quelques années : le Systems Biology Markup Language (ou SBML). Ce langage fournit un consensus de modélisation, permet une intégration aisée des modèles dans des bases de données (Hucka et al., 2003; Le Novère et al., 2009) et peut être aussi bien exploité que généré par des logiciels dédiés (pour une liste des logiciels existants, voir le site du SBML [1]).

1. http ://sbml.org/

Nous présentons ici un modèle continu des voies moléculaires du VEGF, dont nous détaillons la construction sur la base des données disponibles dans la littérature dont nous analysons la sensibilité à certains paramètres. Nous utilisons ce modèle pour simuler l'effet de thérapies ciblées agissant à différents niveaux des voies de signalisation.

4.2 Article : A structural model of the VEGF signalling pathway : emergence of robustness and redundancy properties

L'article présenté ici a été acccepté le 7 septembre 2012 pour publication dans le journal Mathematical Biosciences and Engineering.

MATHEMATICAL BIOSCIENCES
AND ENGINEERING
Volume **10**, Number **1**, February **2013**

doi:10.3934/mbe.2013.10.xx

pp. **X–XX**

A STRUCTURAL MODEL OF THE VEGF SIGNALLING PATHWAY: EMERGENCE OF ROBUSTNESS AND REDUNDANCY PROPERTIES

Floriane Lignet
Vincent Calvez
Emmanuel Grenier
Benjamin Ribba

INRIA, Project-team NUMED, Ecole Normale Supérieure de Lyon,
46 allée d'Italie, 69007 Lyon Cedex 07, France.

(Communicated by the associate editor name)

Abstract. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is known as one of the main promoter of angiogenesis - the process of blood vessel formation. Angiogenesis has been recognized as a key stage for cancer development and metastasis. In this paper, we propose a structural model of the main molecular pathways involved in the endothelial cells response to VEGF stimuli. The model, built on qualitative information from knowledge databases, is composed of 38 ordinary differential equations with 78 parameters and focuses on the signalling driving endothelial cell proliferation, migration and resistance to apoptosis. Following a VEGF stimulus, the model predicts an increase of proliferation and migration capability, and a decrease in the apoptosis activity. Model simulations and sensitivity analysis highlight the emergence of robustness and redundancy properties of the pathway. If further calibrated and validated, this model could serve as tool to analyse and formulate new hypothesis on the VEGF signalling cascade and its role in cancer development and treatment.

1. **Introduction.** Cancer angiogenesis is a crucial process by which endothelial cells from pre-existing blood vessels are recruited through secretion and signalling of growth factors mainly produced by tumour and stroma cells. The process leads to the formation of new blood vessels improving oxygen and nutrient supply to the tumour [21, 12]. The vascular Growth Factor (VEGF) and its receptors (VEGFRs) are often referred as key molecules of this process. The VEGF family comprises VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, PlGF (placenta growth factor) and svVEGF(snake venom VEGF). Each of these genes can undergo alternative splicing and generate several isoforms [60]. $VEGF_{165}$ is the predominant isoform of VEGF-A and is involved in the recruitment of endothelial cells and change in vessel permeability during the process of angiogenesis [60, 19].

$VEGF_{165}$ can bind several specific tyrosine kinase receptors such as VEGFR-1 and VEGFR-2 [19]. VEGFR-2 appears to be the main receptor involved in pathological angiogenesis, and stands thus as the target of several antiangiogenic drug

2010 *Mathematics Subject Classification.* Primary: 92C42, 92C45, 92E20 ; Secondary: 65L99.
Key words and phrases. Systems biology, networks; kinetics in biochemical problems; molecular reactions; ordinary differential equations; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) signalling.

compounds [47]. $VEGF_{165}$ binding to the VEGFR-2 leads to the phosphorylation of the intracellular kinase domain of the receptor, which can then activate the three main molecular pathways of the endothelial cells, namely, proliferation, migration and survival [18, 13].

Several drugs have been developed with the aim of inhibiting the process of angiogenesis. These therapeutic compounds target the binding of VEGF to its receptors either by "capturing" the ligand before its binding or by inhibiting the phosphorylation of the receptor kinase domains which normally results from the binding [20, 17]. VEGF can be trapped by large molecules such as monoclonal antibodies (MAbs). For example, Bevacizumab is one of the famous MAbs developed to inhibit the process of angiogenesis. Receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKis) are in general small molecules. Sunitinib and Sorafenib are two recently developed RTKis. In addition to these two classes of drugs, innovative compounds also attempt to inhibit the molecules within the signalling cascade. For instance, Enzastaurin inhibits the activation of the proteine kinase C (PKC) activation [45].

Modelling of signalling pathway is a quite recent and growing field of research also referred as "Systems Biology". Models generally consists of discrete or continuous mathematical formalisms describing the time-evolution of (part of) the molecules composing the signalling cascade. In particular, continuous models generally involve several coupled ordinary differential equations (ODEs) based on mass action kinetics and Michaelis-Menten functions.

The studies of such complex models have driven the identification of some recurrent properties. Among them, robustness, as the capacity to resist to severe perturbations, and redundancy, as alternative ways to generate an output in the face of perturbations, seem to be common emerging properties of these complex living systems [14, 7]. These two traits were also highlighted in the context of cancer development [34] and in particular for the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway [54, 37].

The VEGF receptor has received less attention even if the corresponding signalling cascade is partially described in the literature [47, 58, 15].

An adjacent field of research, namely "Biomathematics", is also taking advantage of systems biology models to develop multiscale models of cancer. In this approach, molecular models describing intracellular signalling pathways are coupled to cellular and/or tissue description of tumour growth and treatment. Recently, Wang and co-workers developed a multiscale model of non-small cell lung cancer growth integrating a model of the the EGFR pathway which "pilots" the behaviour of cells in a 2 dimensional lattice ([64]). Scianna and co-workers also proposed a multiscale model of vasculogenesis by coupling a cellular potts model (CPM) describing endothelial cells with a simplified partial differential equation model of VEGF-induced molecular reactions [55]. Finally, we have also proposed a multiscale model of avascular tumor growth by integrating a discrete boolean-like gene regulatory network regulating tumour cell proliferation, quiescence and apoptosis [52].

The objective of the present work was to develop a structural model of the signalling pathways downstream VEGFR-2 based on qualitative knowledge found in

the literature and dedicated databases. The model was used as a simulation tool to explore the system and its complexity.

2. Methods.

2.1. Model building.

The model was built based on available literature knowledge and dedicated databases on gene regulatory networks. Two sources of information were mainly used to design the structure of the model. The first is Pubmed[1] from which systematic research through the Mesh ontology was performed. The second was the Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes[2] (KEGG) which presents a structural map of the VEGF signalling pathway. Based on these information, our model contains three main pathways downstream the receptor VEGFR-2, namely proliferation, migration and survival. It is schematically represented in Figure 1 and relies on the following assumptions:

- $VEGF_{165}$, further simply denoted VEGF, binds to VEGFR-2 located at the surface of endothelial cells which leads to the formation of homodimers and to the auto-phosphorylation of the intracellular kinase domains [47]. This will results in an activation of the molecules at the top of three signalling cascades:
- Proliferation [15]: the phospholipase Cγ (PLCγ) is recruited and phosphorylated by the tyrosine 1175 of VEGFR-2 [13, 57]. It leads to the activation of Protein Kinase C (PKC) [49], and then the activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway through Raf, Ras, MEK (a MAPK kinase) and ERK (extracellular-signal-regulated kinase);
- Migration [39, 30]: Actin reorganization and consequent cellular migration is activated through the phosphorylation of p38 that triggers the phosphorylation of MAKPAPK (MAPK activating protein kinase) and then the phosphorylation of the heat-shock protein (Hsp27).
- Survival [25, 63]: Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is a lipid kinase whose phosphorylation through the binding to VEGFR-2 allows for the transformation of PIP2 into PIP3. PIP3 can then bind to Akt which is in turn bi-phosphorylated by the phosphoinositide-dependent Kinases (PDK). The resulting product, AktPIPP, can then phosphorylate the caspase 9 (Casp9). The phosphorylated form of Casp9P is known to prevent from apoptosis.

2.2. Model equations.

We modelled the dynamics of reactions using mass action kinetics and described the reaction rates as proportional to the reacting molecules concentrations. For instance, in the reaction $A + B \rightleftharpoons AB$, the compounds A and B bind each other to form a stable complex AB at rate k_1. Reversely, the product AB dissociates into A and B at rate k_{-1}. The speed of the reaction is then given by:

$$v = k_1[A][B] - k_{-1}[AB]. \tag{1}$$

For some complex multistep reactions, such as phosphorylations, we used the Michaelis-Menten approximation. This allows for reducing the complexity of the system description still maintaining the main dynamical property of the reaction: For instance, $A^* + B \rightleftharpoons A^*B \rightarrow A^* + B^*$ where A^* is the so-called reaction catalyzer of the

[1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed
[2] http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

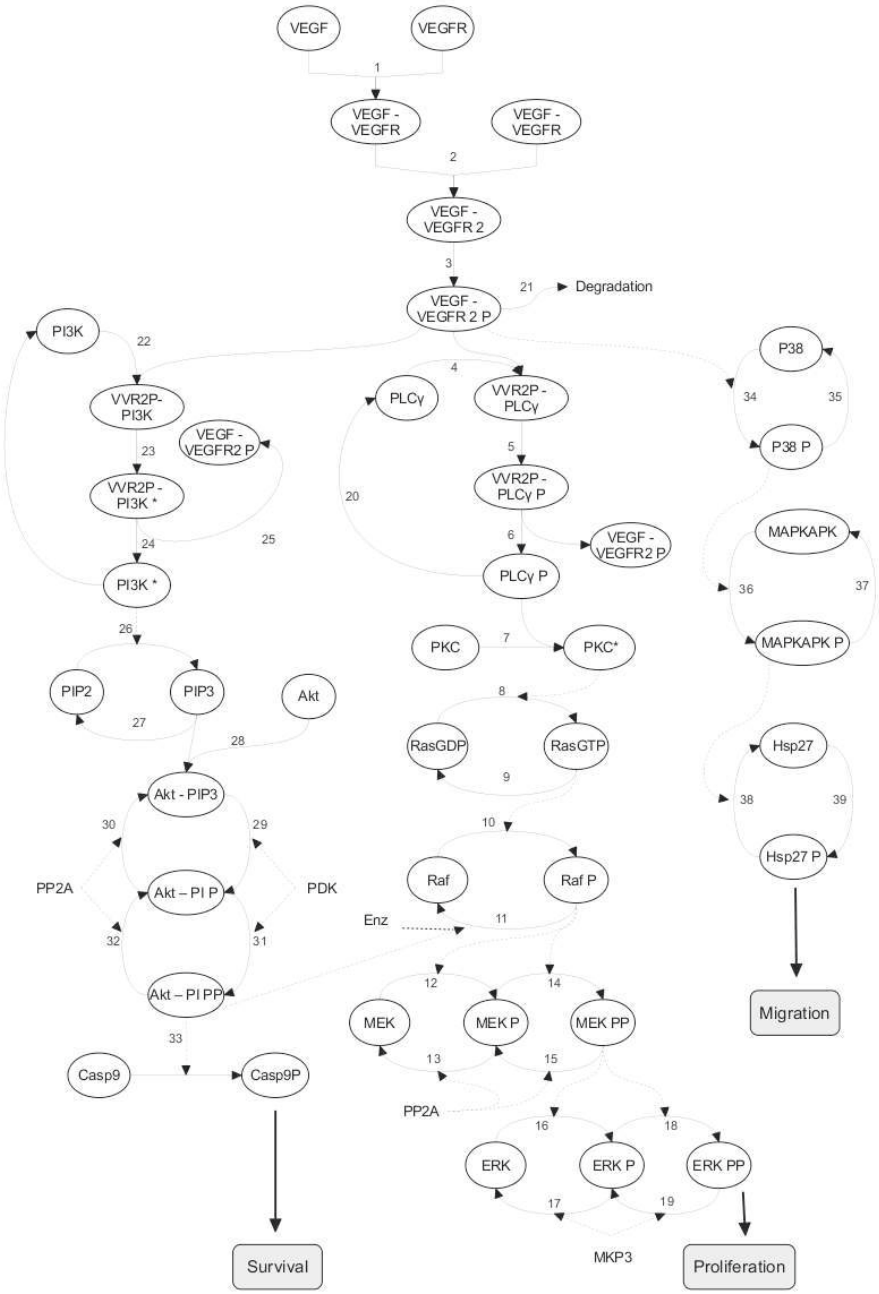

FIGURE 1. Molecular pathways of VEGFR-2 downtream signalling in endothelial cells.

activation of B into B^* can be simplified to $A^* + B \to B^*$ given the corresponding

rate equation :

$$v = \frac{V \cdot [A^*][B]}{K + [B]}, \tag{2}$$

which is the Michaelis-Menten equation. When several reactions are triggered by the same catalyzer, the rate equations can become complex as the molecules compete for the same catalyzer. In this case, the corresponding reaction rates will depend on the concentrations and kinetic properties of all the "rivals" (we invite the reader to refer to the Appendix B in [27] and Figure 3 in [3] for further technical details).

All the rate equations encompassed in the model are described in Table 1.

In consequence, assuming the molecular concentrations continuous, and the reactions happening - on a deterministic fashion - in a homogeneous medium of a volume large enough, we can describe the time-dynamic of each molecule of the model with an ODE:

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum v_{prod,c_i} - \sum v_{cons,c_i}, \tag{3}$$

where v_{prod,c_i} and v_{cons,c_i} are respectively the velocities of the reactions producing and consuming the molecule c_i.

The complete set of model equations is presented in Table 2.

The model is composed by a system of 38 ordinary differential equations including 78 parameters. Solving this system provides the dynamic of all the model variables (molecules) over time. The model was implemented in Scilab[3] and function *ode*, based on the Runge-Kutta method on order 4, was used to solve our system.

2.3. **Model calibration and sensitivity analysis.** Model calibration is the process by which parameter values are identified and estimated. Experimentally, it is highly challenging to collect enough high quality data to effectively estimate parameter values. In consequence, since we did not have time series experiments of VEGF signallization to which compare our simulations, our model is calibrated on the basis of knowledge on different molecular systems, as most biological pathway models. Indeed we relied on previous published works to provide quantitative information to our model parameters. In particular, the parameters relative to the proliferation and survival pathways were taken from [27] whereas the parameters relative to the migration pathway were estimated to fit the molecules dynamics presented in [28]. All our model parameter values are presented in table 3.

To integrate these external values into our system, we fixed arbitrarily two model parameters. These parameters regulate the degradation of the phosphorylated dimer VEGF-VEGFR2 (see reaction 21 in Table 1). Obviously, these parameters are, a-priori, highly important in our model since all the three downstream pathways rely on the phosphorylated dimer. To study the influence of this parameters values on the dynamics of our system, we simulated the response of the model to a one-fold increase of VEGF stimuli for a set of twenty different values of the two parameters. We picked up these 20 values in uniformly distributed interval with length two $\log_{10}$-fold around the baseline arbitrary fixed values.

[3] http://www.scilab.org

3. **Results.** Practically, to analyze the behaviour of our system, it is not feasible to represent the time-evolution of the 38 model variables. In consequence, we selected a set of three molecules to represent at best the behaviour of the three pathways. In this respect, the bi-phosphorylated extracellular-signal-regulated kinase (ERK-PP), the phosphorylated heat-shock protein 27 (Hsp27-P) and the phosphorylated Caspase 9 (Casp9-P) will always be represented in the figure results.

3.1. **Complexity of MEK/ERK loop in response to the ligand stimuli.** We first analyzed the dynamic of the modelled system in response to several intensity of VEGF stimuli. For this, the model was simulated with 5, 10 and 50 nM of VEGF stimuli (Figure 2) as the 50 nM concentration was found to correspond to the saturation concentration.

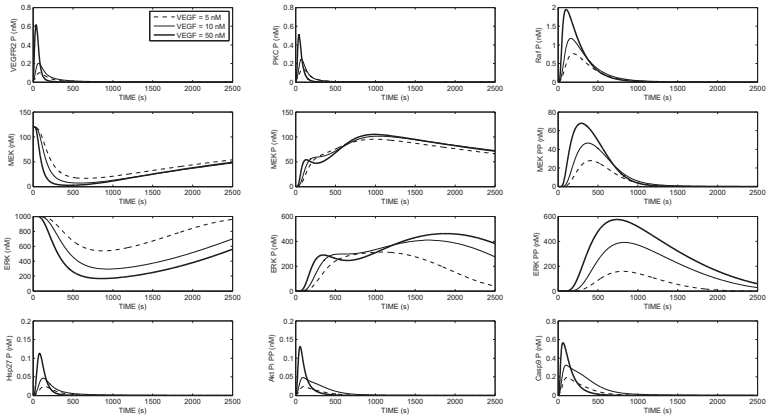

FIGURE 2. Dynamic of the main molecules in the VEGFR signalling pathway in response to different VEGF stimuli: Dashed : 5 nM, Thin : 10nM, Thick : 50nM. Included is the phosphorylated VEGFR dimer at the top left of the figure.

Most of the model molecules, including those of the migration and survival pathway, show a rather expected dynamic similar to the time-course profile of the VEGF signal, i.e. a quick increase to a maximum, followed by a decrease to the molecule baseline value. However, the molecules of the proliferation pathway behave quite differently, in particular the MEK and ERK forms. First of all, MEK, ERK, MEK-PP and ERK-PP react with an important delay. Then, for MEK-P and ERK-P a local maximum appears for the highest VEGF concentration. However, this seems to have no consequence on the downstream molecules MEK-PP and ERK-PP. These results highlight the complex dynamic of the MEK/ERK loop characterized by highly different values of reaction rates so that reactions can be slowed down at a certain stage of the pathway and be further accelerated at a successive stage.

To analyze in more detail the effect of the increase of VEGF, we represented in Figure 3 the variation of maximum value reached for each molecule and the variation of the time at which this maximum is reached when the concentration of VEGF increases by one fold, from 5 to 10 nM (note: for molecules whose amount is reduced

by the normal activation of the pathway, by consumption or phosphorylation, we consider the minimum value reached and the time at which it is reached). For most of the network molecules, such a ligand concentration increase leads to a faster reaction (on average -10% of time needed to reach the maximum value) and an higher maximum value (increase between 50 and 100%), as it is expected. But for the MEK/ERK, activation seems to be delayed; in particular for ERK-P, whose maximum appears significantly delayed when the VEGF stimuli increases. ERK-PP signal is also increased by 146% while slightly delayed in time.

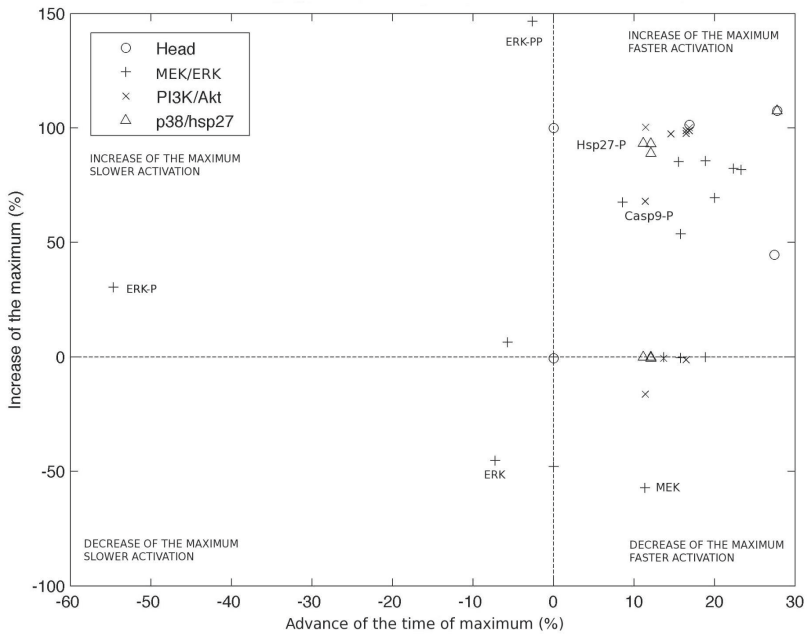

FIGURE 3. Variation of the value of the maximum (resp. the minimum for consumed molecules) versus the variation of time to reach the maximum (resp. the minimum), in %, with respect to a stimulus of 5nM of VEGF, when VEGF stimulus increases by one-fold, from 5 to 10 nM. The molecules are represented depending on the branch they belong to. Circles represent the molecules of the head of the signalling pathway, meaning VEGF, VEGFR and all the compounds formed by their association. Crosses are the molecules of the proliferation branch, leading to the phosphorylation of MEK and ERK. Xs are the molecules of the survival branch, that activates PI3K and Casp9. Triangles are the molecules of the migration branch, whose main actors are Hsp27 and p38.

3.2. **System robustness and emergence of redundancy.** When analyzing the sensitivity of our system to a change in the two constant rates of the phosphorylated dimer VEGF-VEGFR2 degradation, by considering the impact of these parameters

changes on the response of the system to a two fold increase of VEGF stimulation. The dynamics observed for each molecule remain comparable to the dynamics presented in fig 2. We observed that only the ERK forms (at the bottom of the pathway) were sensitive to the changes of the constant rates values (see Figure 4 and Figure 5). Interestingly, the changes do not affect the qualitative effect of VEGF stimuli increases which still leads to a delay in the response of ERK-P, a lower maximum for ERK, and an increase of the maximal amount of ERK-PP. No other molecules seem to be affected by these changes. In conclusion, the system is globally robust to the change in the values of these two important constant rates.

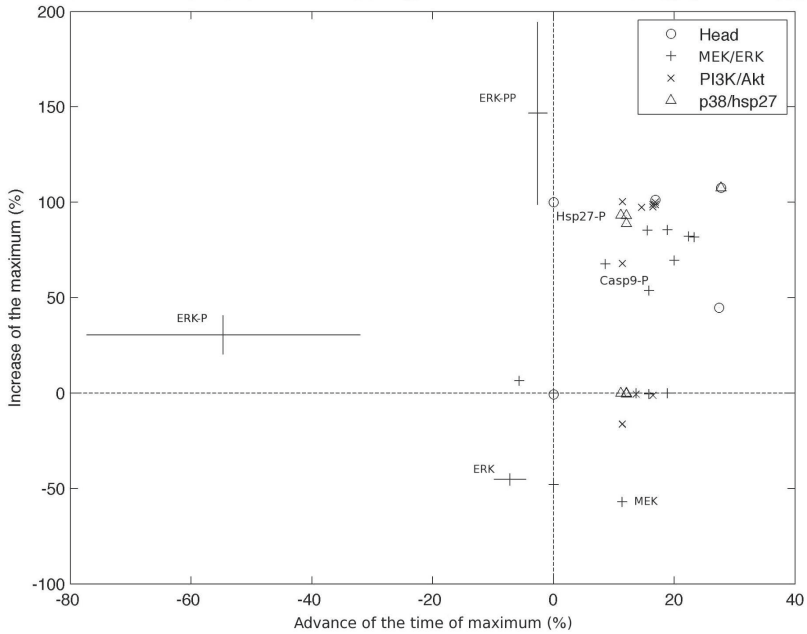

FIGURE 4. Influence of a modification in the value of the constant rate k21, involved in the phosphorylated dimer VEGF-VEGFR2 degradation, on the system measured as a change in the value of the maximum (resp. the minimum for consumed molecules) reached (y-axis) and in the time at which this maximum (resp. minimum) is reached (x-axis). The bars represent the range of the variation when the value of k21 is increased or decreased ten fold.

Finally, we also simulated the blockade of particular molecules within the pathway by reducing the speed of their corresponding activating reactions. As before, we evaluated the variation of the amplitude of the maximum concentration reached by the different molecules as well as the time at which this maximum is reached. We decided to focus on the consequences of a blockade of PKC phosphorylation (reaction number 7 on fig. 1, in the proliferation pathway) and Akt binding to PIP3 (reaction number 28 on fig. 1, in the survival pathway). These blockade were

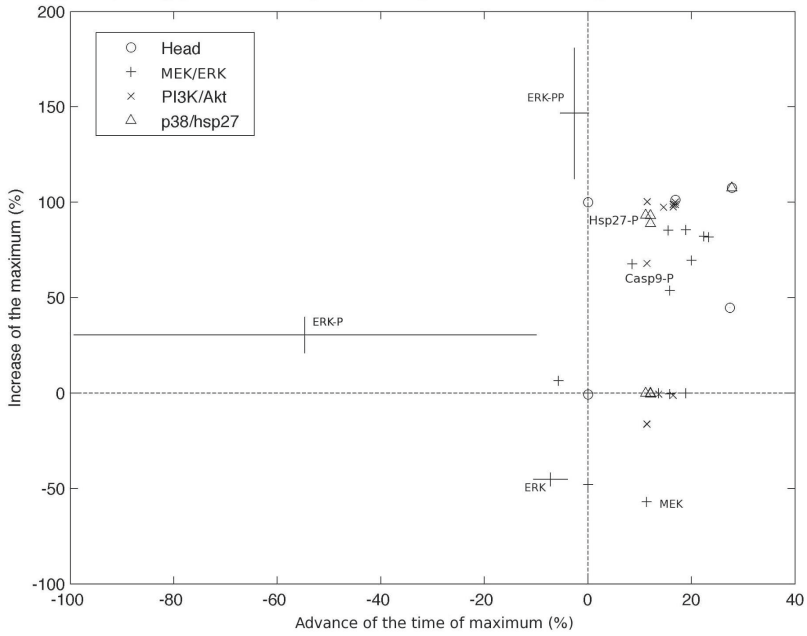

FIGURE 5. Influence of a modification in the value of the constant rate km21, involved in the phosphorylated dimer VEGF-VEGFR2 degradation, on the system measured as a change in the value of the maximum (resp. the minimum for consumed molecules) reached (y-axis) and in the time at which this maximum (resp. minimum) is reached (x-axis). The bars represent the range of the variation when the value of k21 is increased or decreased ten fold.

achieved by modifying the reaction parameters to values that leads to a reduction by half of the maximal amount of molecules normally produced by these reactions (respectively PKC-P and Akt-PIP3).

The blockade of PKC phosphorylation leads to a decrease of the maximum amount of ERK-PP secreted (more than 25% decrease compared to the unblocked situation), to which corresponds an accumulation of the non phosphorylated form ERK (see Figure 6). An interesting point is the simultaneous slight increase of Casp9 related to a decrease of its phosphorylation into Casp9-P. ERK-PP being related to the cellular proliferation, and Casp9 to the survival pathway (Casp9-P is the inactivated form, i.e. the phosphorylation of Casp9 triggers a resistance to apoptosis and thus survival), this results means that inhibiting proliferation by targeting PKC confer to the cell a higher sensitivity to apoptosis. This demonstrates the redundancy of the system towards an inhibition of the proliferation pathway.

Reversely, we also observed a slight reduction of the proliferation activity, in terms of time at which ERK and ERK-PP reach maximum, when inhibiting the binding of Akt to PIP3. Even if this reduction is not significant, it highlights the link between the proliferation and apoptotic pathways. The blockade Akt binding

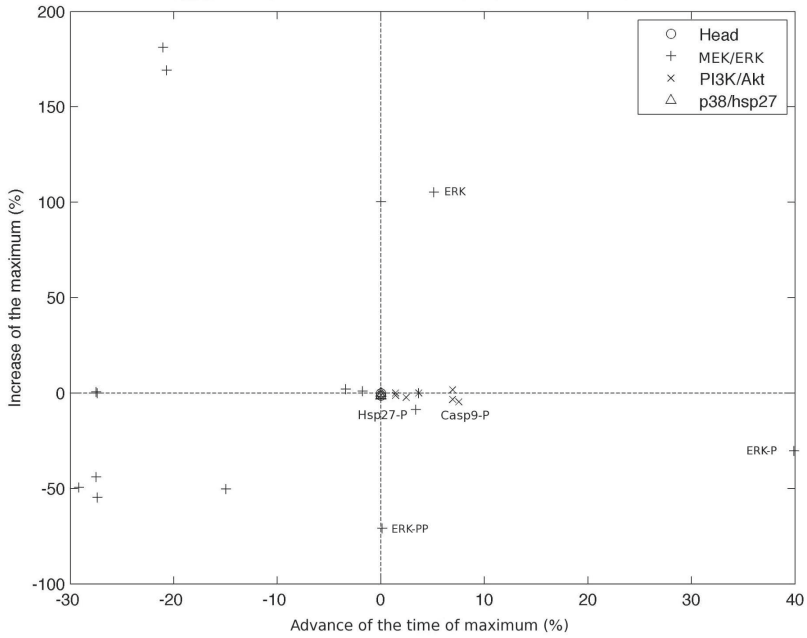

FIGURE 6. Influence of a blocking in PKC phosphorylation, on the system measured as a change in the value of the maximum (resp. the minimum for consumed molecules) reached (y-axis) and in the time at which this maximum (resp. minimum) is reached (x-axis).

mainly leads to an accumulation of Casp9 (see Figure 7) linked to a reduction of the phosphorylated, apoptotic resistance related form Casp9.

4. **Discussion.** Based on literature information from Pubmed and from the Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes (KEGG), we developed a model of the VEGFR-2 intracellular signalling pathway. This model mainly focuses on the proliferation, migration and survival pathways of the endothelial cells composing blood vessels. With parameter values taken from existing publications, the model was used as a simulation tool to analyse the complexity of the underlying system.

Some remarks need to be formulated regarding the structure of our model. First, we limited our analysis to the pathways triggering proliferation, migration and survival of the endothelial cells, whereas VEGFR-2 is known to drive also variations of the vascular permeability. We omitted this feature since we found contradictory information on how permeability was driven by the VEGFR-2 signalling network. It also appears that change in the vascular permeability may significantly depends on the shape and adhesion properties of the cells composing the vessels [15, 47].

We also chose to not consider the genetic mechanisms triggered by the studied signalling pathways. In particular, transition from ERK-PP, Hsp27-P or Casp9-P involve complex processes that go from DNA transcription to protein synthesis. We decided to limit our description at the cytoplasmic level (in opposition to the

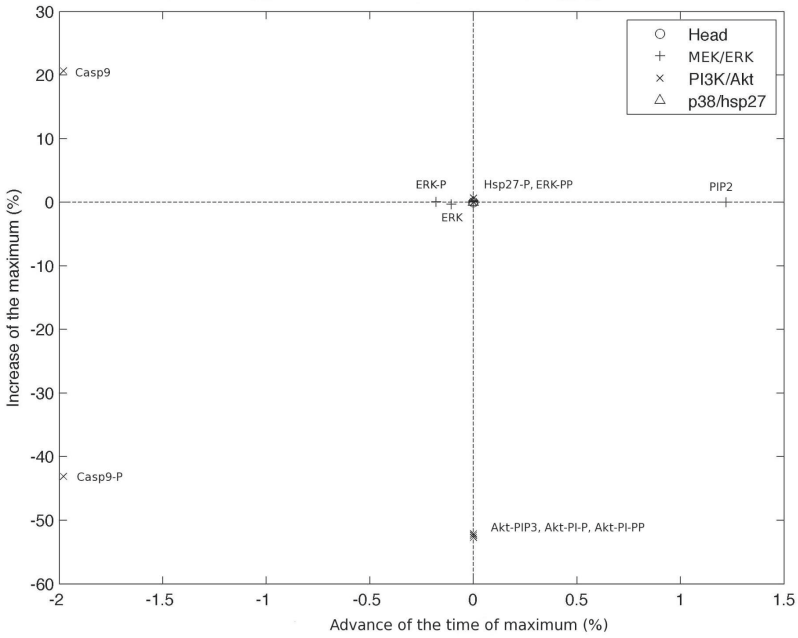

FIGURE 7. Influence of inhibiting the binding of Akt to PIP3 which leads to an accumulation of Casp9, on the system measured as a change in the value of the maximum (resp. the minimum for consumed molecules) reached (y-axis) and in the time at which this maximum (resp. minimum) is reached (x-axis).

nucleic level). We also described the receptor dynamic with simple laws of action mass kinetics in order to have a consistent level of description in the whole model whereas complex models of VEGFR-2 dimerization have already been proposed (see for instance [2]). Finally, we did not consider the variation of receptor density at the surface of endothelial cells that can be observed during angiogenic processes, as VEGFR-2 concentration is up-regulated by hypoxia [47] and by cell density [44]. It is also worthwhile to mention that special standards and methods [3, 46, 10] as well as tools [35, 4], not used in the present work, have been proposed for homogenizing the development and encoding of this type of systems biology models.

Still, our model simulations revealed two important features of complex living systems. We first highlighted the complexity and difference in the dynamics of the proliferation, migration and survival pathways downstream the VEGF receptor. The proliferation pathway appeared to be the most sensitive, with peculiar response, to an increase of the VEGF input. However, its increase was delayed in time with respect to the migration and survival pathways. In addition to that, robustness emerged when perturbing the system with a change in the upstream parameters involved in the phosphorylated dimer VEGF-VEGFR2 degradation, and redundancy occurred between the proliferation and the survival pathways. This model, being a

qualitative tool, appears to be potentially interesting to analyze and formulate new hypothesis on the VEGF signalling cascade.
As most of biomathematicians, working in the field of cancer modelling, attempt to build multiscale model with integrated molecular pathways, our model could serve as the molecular piece of the puzzle to reach an holistic and integrative framework of tumour growth and treatment.

5. **Acknowledgements.** FL and BR wish to acknowledge the team "EMR UCBL/HCL 3738, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France" and its head Prof. Gilles Freyer for having hosting them during the very early start of this work.

Reaction	Rate equation
v_1	$k_1\,[VEGF]\,[VEGFR] - km_1\,[VEGF.VEGFR]$
v_2	$k_2\,[VEGF.VEGFR]^2 - km_2\,[VEGF.VEGFR2]$
v_3	$k_3\,[VEGF.VEGFR2] - km_3\,[VEGF.VEGFR2P]$
v_4	$k_4\,[VEGF.VEGFR2P]\,[PLC\gamma] - km_4\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma s]$
v_5	$k_5\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma] - km_5[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P]$
v_6	$k_6\,[VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P] - km_6\,[PLC\gamma P]\,[VEGF.VEGFR2P]$
v_7	$k_7\,[PLC\gamma P][PKC] - km_7\,[PKC*]$
v_8	$V_8\,[PKC*]\,[RasGDP]/(K_8 + [RasGDP])$
v_9	$V_9\,[RasGTP]/(K_9 + [RasGTP])$
v_{10}	$V_{10}\,[RasGTP][Raf]/(K_{10} + [Raf])$
v_{11}	$V_{11}\,(AktPIPP + Enz)\,[RafP]/(K_{11} + [RafP])$
v_{12}	$V_{12}\,[RafP][MEK]/(K_{12}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{14}}) + [MEK])$
v_{13}	$V_{13}\,[PP2A][MEKP]/(K_{13}\,(1 + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[AktPIP]}{K_{30}} + \frac{[AktPIPP]}{K_{32}}) + [MEKP])$
v_{14}	$V_{14}\,[RafP][MEKP]/(K_{14}\,(1 + \frac{[MEK]}{K_{12}}) + [MEKP])$
v_{15}	$V_{15}\,[PP2A][MEKPP]/(K_{15}\,(1 + \frac{[MEK]}{K_{13}} + \frac{[AktPIP]}{K_{30}} + \frac{[AktPIPP]}{K_{32}}) + [MEKPP])$
v_{16}	$V_{16}\,[MEKPP]\,[ERK]/(K_{16}\,(1 + \frac{[ERKP]}{K_{18}}) + [ERK])$
v_{17}	$V_{17}\,[MKP3]\,[ERKP]/(K_{17}\,(1 + \frac{[ERKPP]}{K_{19}}) + [ERKP])$
v_{18}	$V_{18}\,[MEKPP]\,[ERKvP]/(K_{18}\,(1 + \frac{[ERK]}{K_{16}}) + [ERKP])$
v_{19}	$V_{19}\,[MKP3]\,[ERKPP]/(K_{19}\,(1 + \frac{[ERKP]}{K_{17}}) + [ERKPP])$
v_{20}	$V_{20}\,[PLC\gamma P]/(K_{20} + [PLC\gamma P])$
v_{21}	$V_{21}\,[VEGF.VEGFR2P]/(K_{21} + [VEGF.VEGFR2P])$
v_{22}	$k_{22}\,[PI3K]\,[VEGF.VEGFR2P] - km_{22}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K]$
v_{23}	$k_{23}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K] - km_{23}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K*]$
v_{24}	$k_{24}\,[VEGF.VEGFR2P.PI3K*] - km_{24}\,[VEGF.VEGFR2P]\,[PI3K*]$
v_{25}	$V_{25}\,[PI3K*]/(K_{25} + [PI3K*])$
v_{26}	$V_{26}\,[PI3K*]\,[PIP2]/(K_{26} + [PIP2])$
v_{27}	$V_{27}\,[PIP3]/(K_{27} + [PIP3])$
v_{28}	$k_{28}\,[PIP3]\,[Akt] - km_{28}[Akt.PIP3]$
v_{29}	$V_{29}\,[PDK]\,[Akt.PIP3]/(K_{29}\,(1 + \frac{[AktPIP]}{K_{31}}) + [Akt.PIP3])$
v_{30}	$V_{30}\,[PP2A]\,[AktPIP]/(K_{30}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{13}} + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[AktPIPP]}{K_{32}}) + [AktPIP])$
v_{31}	$V_{31}\,[PDK]\,[AktPIP]/(K_{31}\,(1 + \frac{[Akt.PIP3]}{K_{29}}) + [AktPIP])$
v_{32}	$V_{32}\,[PP2A]\,[AktPIPP]/(K_{32}\,(1 + \frac{[MEKP]}{K_{13}} + \frac{[MEKPP]}{K_{15}} + \frac{[AktPIP]}{K_{30}}) + [AktPIPP])$
v_{33}	$k_{33}\,[AktPIPP]\,[Casp9] - km_{33}\,[Casp9P]$
v_{34}	$V_{34}\,[VEGF.VEGFR2P][P38]/(K_{34} + [P38])$
v_{35}	$V_{35}\,[P38P]/(K_{35} + [P38P])$
v_{36}	$V_{36}\,[P38P][MAPKAPK]/(K_{36} + [MAPKAPK])$
v_{37}	$V_{37}\,[MAPKAPK.P]/(K_{37} + [MAPKAPK.P])$
v_{38}	$V_{38}\,[MAPKAPK.P][Hsp27]/(K_{38} + [Hsp27])$
v_{39}	$V_{39}\,[Hsp27P]/(K_{39} + [Hsp27P])$

TABLE 1. Reactions and rate equations of the model.

Molecule	Differential equation
$VEGF$	$-v_1$
$VEGFR$	$-v_1$
$VEGF.VEGFR$	$v_1 - 2 * v_2$
$VEGF.VEGFR2$	$v_2 - v_3$
$VEGF.VEGFR2P$	$v_3 - v_4 + v_6 - v_{21} - v_{22} + v_{24}$
PLC_γ	$-v_4 + v_{20}$
$VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma$	$v_4 - v_5$
$VEGF.VEGFR2P.PLC_\gamma P$	$v_5 - v_6$
$PLC_\gamma P$	$v_6 - v_7 - v_{20}$
PKC	$-v_7$
$PKC*$	v_7
$RasGDP$	$-v_8 + v_9$
$RasGTP$	$v_8 - v_9$
Raf	$-v_{10} + v_{11}$
$RafP$	$v_{10} - v_{11}$
MEK	$-v_{12} + v_{13}$
$MEKP$	$v_{12} - v_{13} - v_{14} + v_{15}$
$MEKPP$	$v_{14} - v_{15}$
ERK	$-v_{16} + v_{17}$
$ERKP$	$v_{16} - v_{17} - v_{18} + v_{19}$
$ERKPP$	$v_{18} - v_{19}$
$PI3K$	$-v_{22} + v_{25}$
$VEGF.VEGFR2P.PI3K$	$v_{22} - v_{23}$
$VEGF.VEGFR2P.PI3K*$	$v_{23} - v_{24}$
$PI3K*$	$v_{24} - v_{25}$
$PIP2$	$-v_{26} + v_{27}$
$PIP3$	$v_{26} - v_{27} - v_{28}$
Akt	$-v_{28}$
$Akt.PIP3$	$v_{28} - v_{29} + v_{30}$
$Akt.PI.P$	$v_{29} - v_{30} - v_{31} + v_{32}$
$Akt.PI.PP$	$v_{31} - v_{32} - v_{33}$
$Casp9$	$-v_{33}$
$Casp9P$	v_{33}
$P38$	$-v_{34} + v_{35}$
$P38P$	$v_{34} - v_{35}$
$MAPKAPK$	$-v_{36} + v_{37}$
$MAPKAPKP$	$v_{36} - v_{37}$
$Hsp27$	$-v_{38} + v_{39}$
$HSP27P$	$v_{38} - v_{39}$

TABLE 2. List of all molecules and corresponding equations

Parameter	Value	Source	Parameter	Value	Source
k_1	0.0012	[27]	km_1	0.00076	[27]
k_2	0.01	[27]	km_2	1	[27]
k_3	1	[27]	km_3	0.01	[27]
k_4	0.06	[64]	km_4	0.2	[64]
k_5	1	[64]	km_5	0.05	[64]
k_6	0.3	[64]	km_6	0.006	[64]
k_7	0.214	[64]	km_7	5.35	[64]
V_8	0.222	[27]	K_8	0.181	[27]
V_9	0.289	[27]	K_9	0.0571	[27]
V_{10}	1.53	[27]	K_{10}	11.7	[27]
V_{11}	0.00673	[27]	K_{11}	8.07	[27]
V_{12}	3.5	[27]	K_{12}	317	[27]
V_{13}	0.058	[27]	K_{13}	2200	[27]
V_{14}	2.9	[27]	K_{14}	317	[27]
V_{15}	0.058	[27]	K_{15}	60	[27]
V_{16}	9.5	[27]	K_{16}	146000	[27]
V_{17}	0.3	[27]	K_{17}	160	[27]
V_{18}	16	[27]	K_{18}	146000	[27]
V_{19}	0.27	[27]	K_{19}	60	[27]
V_{20}	1	[64]	K_{20}	100	[64]
V_{21}	6	Est	K_{21}	50	Est.
k_{22}	0.1	[27]	km_{22}	2	[27]
k_{23}	9.85	[27]	km_{23}	0.0985	[27]
k_{24}	45.8	[27]	km_{24}	0.047	[27]
V_{25}	2620	[27]	K_{25}	3680	[27]
V_{26}	16.9	[27]	K_{26}	39.1	[27]
V_{27}	17000	[27]	K_{27}	9.02	[27]
k_{28}	507	[27]	km_{28}	234	[27]
V_{29}	20000	[27]	K_{29}	80000	[27]
V_{30}	0.107	[27]	K_{30}	4.35	[27]
V_{31}	20000	[27]	K_{31}	80000	[27]
V_{32}	0.211	[27]	K_{32}	12	[27]
k_{33}	1	Est.	km_{33}	0.1	Est.
V_{34}	0.1	Est.	K_{34}	20	Est.
V_{35}	1	Est.	K_{35}	50	Est.
V_{36}	0.1	Est.	K_{36}	5	Est.
V_{37}	1	Est.	K_{37}	0.01	Est.
V_{38}	10	Est.	K_{38}	10	Est.
V_{39}	1	Est.	K_{39}	10	Est.
PDK	1	[27]	$PP2A$	11.4	[27]
$MKP3$	2.4	[27]	Enz	7	[27]

TABLE 3. Molecular model parameters. Michaelis-Menten constants ($K_8 \to K_{21}$, K_{25}, K_{26}, K_{27}, $K_{29} \to K_{32}$, $K_{34} \to K_{39}$) are given in nM. $V_8 \to V_{21}$, V_{25}, V_{26}, V_{27}, $V_{29} \to V_{32}$, $V_{34} \to V_{39}$ are expressed in $nM.s^{-1}$. First- and second-order rate constants are given in s^{-1} and $nM^{-1}.s^{-1}$ respectively. The bottom of the table presents the constant concentrations of the enzymes, in nM.

REFERENCES

[1] T. Alarcón, H.M. Byrne and P.K. Maini, *A multiple scale model for tumor growth*, Multiscale Modeling and Simulation, **3** (2005), 440.

[2] T. Alarcón and K.M. Page, *Mathematical models of the VEGF receptor and its role in cancer therapy*, Journal of The Royal Society Interface, **4** (2007), 283

[3] B.B. Aldridge, J.M. Burke, D.A. Lauffenburger and P.K. Sorger, *Physicochemical modelling of cell signalling pathways*, Nature cell biology, **8**, (2006), 1195–1203.

[4] R. Alves, F. Antunes and A. Salvador, *Tools for kinetic modeling of biochemical networks*, Nature biotechnology, **24**, (2006), 667–672.

[5] A.R.A. Anderson and M.A.J. Chaplain, *Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis*, Bulletin of Mathematical Biology, **60**, (1998), 857–899.

[6] R.P. Araujo and D.L.S McElwain, *A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling*, Bulletin of Mathematical Biology, **66**, (2004) 1039–1091.

[7] U.S. Bhalla, R. Iyengar, and others, *Emergent properties of networks of biological signaling pathways*, Science, **283**, (1999), 381.

[8] K. Bartha, and H. Rieger, *Vascular network remodeling via vessel cooption, regression and growth in tumors*, Journal of Theoretical Biology, **241**, (2006), 903–918.

[9] F. Billy, B. Ribba, O. Saut, H. Morre-Trouilhet, T. Colin, D. Bresch, J.P. Boissel, E. Grenier, and J.P. Flandrois, *A pharmacologically based multiscale mathematical model of angiogenesis and its use in investigating the efficacy of a new cancer treatment strategy*, Journal of Theoretical Biology, **260**, (2009), 545–562.

[10] J.P. Boissel, B. Ribba, E. Grenier, G. Chapuisat, and M-A. Dronne, *Modelling methodology in physiopathology*, Progress in Biophysics and Molecular Biology, **97**, (2008), 28–39.

[11] H.M. Byrne and M.A.J. Chaplain, *Growth of nonnecrotic tumors in the presence and absence of inhibitors*, Mathematical biosciences, **130**, (1995), 151–181.

[12] P. Carmeliet and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature, **407**, (2000), 249–257.

[13] S. Cebe-Suarez, A. Zehnder-Fjällman and K. Ballmer-Hofer, *The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships*, Cellular and molecular life sciences, **63**, (2006), 601–615.

[14] A. Citri and Y. Yarden, *EGF–ERBB signalling: towards the systems level*,Nature reviews Molecular cell biology, **7** (2006), 505-516.

[15] M.J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto and L. Claesson-Welsh, *VEGF-receptor signal transduction*, Trends in biochemical sciences, **28** (2003), 488–494.

[16] A. Emde, C.R. Pradeep, D.A. Ferraro, N. Ben-Chetrit, M. Sela, B. Ribba, Z. Kam and Y. Yarden, *Combining epitope-distinct antibodies to HER2: cooperative inhibitory effects on invasive growth*, Oncogene, **30** (2010), 1631–1642.

[17] S. Faivre, G. Demetri, W. Sargent and E. Raymond, *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*, Nature Reviews Drug Discovery, **6** (2007), 734–745/

[18] N. Ferrara, *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*, Nature Reviews Cancer, **2** (2002), 795–803.

[19] N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*, Endocrine reviews, **25** (2004), 581–611.

[20] N. Ferrara, K.J. Hillan and W. Novotny, *Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy*, Biochemical and biophysical research communications, **333** (2005), 326–335.

[21] J. Folkman, *Tumor angiogenesis factor*, Cancer Research, **34** (1974) 2109.

[22] J. Folkman, *New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research.*, European journal of cancer (Oxford, England: 1990), **32** (1996), 2534.

[23] F.M. Gabhann and A.S. Popel, *Systems biology of vascular endothelial growth factors*, Microcirculation, **15** (2008) 715–738.

[24] G. Gasparini, R. Longo, M. Fanelli and B.A. Teicher, *Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions*, Journal of Clinical Oncology, **23** (2005) 1295.

[25] H.P. Gerber,A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway*, Journal of Biological Chemistry, **273** (1998) 30336

[26] F. Graner and J.A. Glazier, *Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model*, Physical Review Letters, **69** (1992), 2013–2016.

[27] M. Hatakeyama, S. Kimura, T. Naka, T. Kawasaki, N. Yumoto, M. Ichikawa, J.H. Kim, K. Saito, M. Saeki, M. Shirouzu, S. Yokoyama and A. Konagaya, *A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling.*, Biochemical Journal, **373** (2003) 451.

[28] B.S. Hendriks, F. Hua and J.R. Chabot, *Analysis of mechanistic pathway models in drug discovery: p38 pathway*, Biotechnology Progress, **24** (2008) 96–109.

[29] C.Y. Huang and J.E. Ferrell, *Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **93** (1996) 10078.

[30] C. Huang, K. Jacobsonand M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*, Journal of cell science, **117** (2004) 4619.

[31] R.K Jain, *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy*, Nature Medicine, **7** (2001) 987–989.

[32] R.K Jain, *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*, Science, **307** (2005), 58.

[33] H. Kitano, *Computational systems biology*, Nature, **420** (2002), 206–210.

[34] H. Kitano, *Cancer robustness: tumour tactics*, Nature, **426** (2003), 125–125.

[35] H. Kitano, A. Funahashi, Y. Matsuoka, and K. Oda, *Using process diagrams for the graphical representation of biological networks*, Nature biotechnology, **23** (2005), 961–966.

[36] M. Kohandel, M. Kardar, M. Milosevic and S. Sivaloganathan, *Dynamics of tumor growth and combination of anti-angiogenic and cytotoxic therapies*, Physics in medicine and biology, **52** (2007), 3665–3677.

[37] B.N. Kholodenko, O.V. Demin, G. Moehren, and J.B. Hoek, *Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor*, Journal of Biological Chemistry, **274** (1999), 30169–30181.

[38] B.N. Kholodenko, *Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades*, European Journal of Biochemistry, **267** (2001), 1583–1588.

[39] L. Lamalice, F. Le Boeuf and J. Huot, *Endothelial cell migration during angiogenesis*, Circulation research, **100** (2007), 782.

[40] D.S. Lee, H. Rieger, and K. Bartha, *Flow correlated percolation during vascular remodeling in growing tumors*, Physical review letters, **96** (2006), 58104.

[41] J. Ma, and D.J. Waxman, *Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment*, Molecular Cancer Therapeutics, **7** (2008), 3670.

[42] , N.V. Mantzaris, S. Webband H.G. Othmer, *Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis*, Journal of Mathematical Biology, **49** (2004), 111-187.

[43] D.B. Mendel, A.D. Laird, X. Xin, S.G. Louie, J.G. Christensen, G. Li, R.E. Schreck, T.J. Abrams, T.J. Ngai, L.B. Lee and others, *In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors*, Clinical cancer research, **9** (2003), 327.

[44] L. Napione, S. Pavan, A. Veglio, A. Picco, G. Boffetta, A. Celani, G. Seano, L. Primo, A. Gamba and F. Bussolino, *Unraveling the influence of endothelial cell density on VEGF-A signaling*, Blood (2012)

[45] N. Normanno, A. Morabito, A. De Luca, M.C. Piccirillo, M. Gallo, M.R. Maiello and F. Perrone, *Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives*, Endocrine-related cancer, **16** (2009), 675.

[46] N. Le Novere, A. Finney, M. Hucka, U.S. Bhalla, F. Campagne, J. Collado-Vides, E.J. Crampin, M. Halstead, E. Klipp, P. Mendes and others, *Minimum information requested in the annotation of biochemical models (MIRIAM)*, Nature biotechnology, **23** (2005), 1509-1515.

[47] A.K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signalling-in control of vascular function*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **7** (2006), 357–371.

[48] T.M Pawlik and K. Keyomarsi, *Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy*, International journal of radiation oncology, biology, physics, **59** (2004), 928–942.

[49] N. Rahimi, *Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials*, Experimental eye research, **83** (2006), 1005–1016.

[50] B. Ribba, O. Saut, T. Colin, D. Bresch, E. Grenier and J.P. Boissel, *A multiscale mathematical model of avascular tumor growth to investigate the therapeutic benefit of anti-invasive agents*, Journal of theoretical biology, **243** (2006) 532–541.

[51] B. Ribba, B. You, M. Tod, P. Girard, B. Tranchand, V. Trillet-Lenoir and G. Freyer, *Chemotherapy may be delivered based on an integrated view of tumour dynamics*, IET Systems Biology, **3** (2009), 180.

[52] B. Ribba, T. Colin, S. Schnell, *A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies*, Theoretical Biology and Medical Modelling, **3** (2006).

[53] S. Sanga, J.P. Sinek, H.B. Frieboes, M. Ferrari, J.P. Fruehauf and V. Cristini, *Mathematical modeling of cancer progression and response to chemotherapy*, Expert review of anticancer therapy, **6** (2006), 1361–1376.

[54] B. Schoeberl, C. Eichler-Jonsson, E.D. Gilles and G. Muller, *Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors*, Nature biotechnology, **20** (2002), 370–375.

[55] M. Scianna, L. Munaron and L. Preziosi, *A multiscale hybrid approach for vasculogenesis and related potential blocking therapies*, Progress in Biophysics and Molecular Biology, **106** (2011), 450–462.

[56] S. Senan and E.F. Smit, *Design of clinical trials of radiation combined with antiangiogenic therapy*, The oncologist, **12** (2007), 465.

[57] M. Shibuya, *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis.*, Journal of biochemistry and molecular biology, **39** (2006), 469.

[58] M. Shibuya and L. Claesson-Welsh, *Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*, Experimental cell research, **312** (2006), 549–560.

[59] M. Simeoni, P. Magni, C. Cammia, G. De Nicolao, V. Croci, E. Pesenti, M. Germani, I. Poggesi and M. Rocchetti, *Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents*, Cancer Research, **64** (2004), 1094.

[60] H. Takahashi and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*, Clinical Science, **109** (2005), 227–241.

[61] R.T. Tong, Y. Boucher, S.V. Kozin, F. Winkler, D.J. Hicklin and R.K. Jain, *Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors*, Cancer research, **64** (2004), 3731.

[62] F. Valeriote and L. van Putten, *Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review*, Cancer Research, **35** (1975), 2619.

[63] I. Vivanco and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.*, Nature Reviews. Cancer, **2** (2002), 489.

[64] Y. Wang, L. Zhang, J. Sagotsky and T.S. Deisboeck, *Simulating non-small cell lung cancer with a multiscale agent-based model*, Theoretical Biology and Medical Modelling, **4** (2007), 50.

[65] Z. Wang, V. Bordas and T. Deisboeck, *Frontiers: Identification of Critical Molecular Components in a Multiscale Cancer Model Based on the Integration of Monte Carlo, Resampling, and ANOVA*, Frontiers in Computational Physiology And Medicine, **2** (2011)

[66] M. Welter, K. Bartha and H. Rieger, *Emergent vascular network inhomogeneities and resulting blood flow patterns in a growing tumor*, Journal of Theoretical Biology, **250** (2008), 257–280.

[67] C.G. Willett, Y. Boucher, F. Di Tomaso, D.G. Duda, L.L. Munn, R.T. Tong, D.C. Chung, D.V. Sahani, S.P. Kalva, S.V. Kozin, and others, *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer*, Nature medicine, **10** (2004), 145.

[68] F. Winkler, S.V. Kozin, R.T. Tong, S.S. Chae, M.F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D.J. Hicklin, D. Fukumura, E. di Tomaso, L.L. Munn and R.K. Jain , *Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases*, Cancer Cell, **6** (2004), 553–563.

[69] X. Zheng, S.M Wise and V. Cristini, *Nonlinear simulation of tumor necrosis, neovascularization and tissue invasion via an adaptive finite-element/level-set method*, Bulletin of mathematical biology, **67** (2005), 211–259.

Received September 10, 2006; Accepted February 10, 2007.

E-mail address: benjamin.ribba@inria.fr
E-mail address: floriane.lignet@ens-lyon.fr
E-mail address: vincent.calvez@ens-lyon.fr
E-mail address: emmanuel.grenier@ens-lyon.fr

Chapitre 5

Modèle discret de formation de sphéroïdes de cellules mammaires humaines in vitro

5.1 Avant-propos

Chaque année en France, plus de 50000 cas de cancer du sein sont diagnostiqués, pour un nombre de décès supérieur à 10000. On observe une sur-expression du récepteur HER2 (Human Epidermial Growth Factor Receptor 2, aussi appelé ErbB2) dans 20 à 30 % des cas. Cette mutation est associée à un faible taux de survie (Slamon et al., 1987). Les tumeurs sur-exprimant HER2 ont en effet des caractéristiques très invasives. D'un point de vue moléculaire, en réponse à la liaison du facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor), le récepteur HER2 stimule la prolifération cellulaire, sa polarisation et sa résistance à l'apoptose. Sa sur-expression peut donc entraîner une augmentation de ces propriétés chez les cellules cancéreuses. Depuis une dizaine d'années, des efforts sont faits pour le développement de traitements dirigés contre le récepteur et les voies moléculaires en aval. Mais, jusqu'à présent, les résultats ne sont pas à la hauteur des attentes, on observe en particulier l'apparition de résistances après quelques mois de traitement (Morrow et al., 2009). On peut par exemple citer le trastuzumab, commercialisé sous le nom d'Herceptin. Malgré de bons résultats en clinique, les patients qui initialemment répondaient au traitement développent des résistances au bout d'un an (Nahta and Esteva, 2006).

Afin de comprendre les raisons de ces échecs, il faut se pencher sur les mécanismes impliqués dans la morphogénèse du cancer du sein, pour comprendre les mécanismes d'action des traitements et expliquer l'apparition de résistances.

Les carcinomes mammaires se développent en général à partir des cellules épithéliales formant les canaux lactifères. Ces cellules sont organisées en couches d'une cellule d'épaisseur autour d'un lumen, le canal lactifère. Elles sont polarisées, sont stabilisées par la membrane basale les entourant et présentent des liaisons inter-cellulaires spécifiques (Bissell and Radisky, 2001; O Brien et al., 2002). Sous l'effet de mutations génétiques, les cellules peuvent acquérir des caractéristiques cancéreuses. La morphogénèse tumorale commence par l'épaississement à plusieurs cellules de large des couches épithéliales. Le lumen devient irrégulier, et les cellules elles-mêmes se déforment, perdant leur polarité (étape dite d'hyperplasie). La prolifération cellulaire augmente, et les cellules envahissent le lumen. Un cœur nécrosé peut apparaître au centre de la masse tumorale (ductal carcinoma in situ ou DCIS) (Valenzuela and Julian, 2007). La tumeur devient alors invasive, les cellules infiltrant le tissu environnant (Hu et al., 2008).

Les propriétés des cellules épithéliales sont classiquement étudiées in vitro grâce à des cultures de cellules MCF10A, issues de tissu mammaire humain, dans un milieu permettant la formation de sphéroïdes (ou acini) (Soule et al., 1990). Ces sphéroïdes imitent les structures observées in vivo (Petersen et al., 1992; Muthuswamy et al., 2001). De plus, des lignées cellulaires transformées pour sur-exprimer le récepteur HER2 créent des amas irréguliers qui présentent des protusions, similaires aux formes cancéreuses in vivo (Muthuswamy et al., 2001; Debnath et al., 2002).

Afin de pouvoir optimiser les traitements anti-cancéreux, il serait en effet intéressant de pouvoir répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les mécanismes mis en jeu dans la morphogénèse tumorale ?
- Quelles propriétés la sur-expression de HER2 confère-t-elle aux cellules épithéliales ?
- Comment cibler efficacement les processus moléculaires activés ?

Or, bien que riches en enseignements, les dispositifs expérimentaux ne permettent qu'une analyse d'un point de vue morphologique, les processus intracellulaires moléculaires sous-jacents n'étant pas forcément évaluables.

La modélisation mathématique pourrait permettre de tester des hypothèses sur les processus en jeu. En particulier, l'utilisation de modèles discrets est particulièrement bien adaptée à la porblématique, détaillant le comportement individuel d'un nombre limité de cellules.

De nombreux modèles discrets ont été développés pour décrire l'évolution de tumeurs, nous citerons ici un échantillon représentatif de la variété existante. La majorité d'entre eux ne sont en fait pas purement discrets, les molé-

cules (l'oxygène, facteurs de croissance ou les inhibiteurs) sont souvent décrites comme diffusant dans le tissu à l'aide d'équations de réaction-diffusion.

On peut par exemple citer le modèle de Graner, Glazier et Hogeweg, ou Cellular Potts Model (CPM). Ce formalisme a tout d'abord été développé pour simuler l'arrangement spatial spontané entre différents types de cellules (Graner and Glazier, 1992; Glazier and Graner, 1993). Les cellules, de volume fini et déformables, sont décrites comme des ensembles de domaines connectés d'une grille. A chaque pas de temps, pour représenter la mobilité cellulaire amoeboïde, l'algorithme de type Monte-Carlo essaie aléatoirement d'étendre ou de rétracter les domaines. Ces changements sont acceptés avec une probabilité qui dépend de la variation de l'énergie totale du système. Cette énergie est calculée à partir des interactions d'adhésion des cellules avec les cellules environnantes et avec la matrice extracellulaire, et d'un paramètre qui représente la mobilité intrinsèque de la cellule. Elle peut aussi prendre en compte des phénomènes de chimiotaxie, d'haptotaxie, de polarisation cellulaire, etc. Ce formalisme a été utilisé pour modéliser la croissance de tumeurs avasculaires vers un état d'équilibre en considérant une prolifération et une nécrose cellulaires dépendant de la quantité d'oxygène diffusant dans le milieu (Stott et al., 1999). Turner *et al.* ont ensuite développé un modèle d'invasion tumoral en introduisant la sécrétion de MMPs, des phénomènes d'haptotaxie, et un contrôle de la prolifération via les adhésions entre cellules. Ils ont ainsi montré que la morphologie obtenue dépendait des propriétés d'adhésion attibuées aux cellules (Turner and Sherratt, 2002). Par ailleurs, Jiang *et al.* ont construit un modèle multi-échelle incorporant un modèle booléen des voies de régulation de l'expression de protéines contrôlant le cycle cellulaire (Jiang et al., 2005). Ils peuvent alors simuler la croissance de sphéroïdes avasculaires composés de couches successives de cellules proliférantes, quiescentes et nécrosées à partir d'une unique cellule cancéreuse.

Drasdo *et al.* ont eux aussi développé un modèle utilisant des cellules de taille finie et dont le comportement dépend d'un algorithme de type Monte-Carlo. Les cellules y sont décrites par des sphères qui peuvent se déformer, notamment pour entrer en mitose. Comme pour le CPM, une énergie dépendant des forces d'attraction entre cellules proches et des contraintes de forme est définie pour l'ensemble du système. Au cours de la simulation, les cellules sont sélectionnées aléatoirement pour tenter une petite translation, une rotation ou un accroissement de leur volume, ces mouvements induisant une pression sur les cellules voisines. La tentative est validée en fonction de la variation de l'énergie du système qu'elle induit. Les auteurs ont tout d'abord considéré une

croissance dépendant uniquement de la compressibilité des cellules (Drasdo and Höhme, 2003). Ils obtiennent un système où seules les cellules situées en périphérie de la tumeur peuvent encore proliférer quand un certain volume est atteint, les cellules au centre ne pouvant pas déplacer toutes les cellules environnantes pour grossir et entrer en mitose. Les auteurs ont ensuite étendu ce modèle pour intégrer une régulation de la croissance par la quantité de nutriments disponibles. Le modèle suggère que le ralentissement de la croissance observé expérimentalement est dû à des mécanismes bio-mécaniques, la limitation en nutriment déterminant la taille du cœur nécrotique, mais pas la taille limite de la tumeur (Drasdo and Höhme, 2005). De nombreux modèles ont été construits à partir du formalisme proposé par Draso et Höhme (Drasdo and Höhme, 2003). Ramis-Conde *et al* ont par exemple décrit les adhésions intercellulaires en intégrant la dynamique de cadhérines et de caténines, molécules transmembranaires impliquées dans les interactions cellulaires (Ramis-Conde et al., 2008). Cela a permis ensuite de modéliser l'intravasation de cellules tumorales au travers de parois de vaisseaux sanguins, les molécules d'adhésion à leur surface permettant une interaction des cellules tumorales avec les cellules endothéliales (Ramis-Conde et al., 2009).

Anderson *et al.* ont développé un automate cellulaire décrivant l'invasion du tissu par la masse tumorale en phase vasculaire (Anderson, 2005). Quatre composants sont considérés : les cellules tumorales, la matrice extracellulaire, les enzymes de dégradation de la matrice (MMPs) et l'oxygène. Le modèle est dit hybride car seules les cellules tumorales sont modélisées de façon discrète, les molécules et la matrice étant décrites par des quantités continues. Le modèle est tout d'abord établi sous forme de système d'EDP de la forme de l'équation (3.3), toutes les variables étant considérées continues. Puis la densité de cellules tumorales est discrétisée par la méthode des différences finies pour isoler des cellules indépendantes (le modèle discret est décrit en détail dans Anderson et al. (2000)). Les probabilités d'une cellule de bouger le long d'une grille cartésienne sont calculées en fonction des adhésions avec le voisinage, des phénomènes d'haptotaxie suivant les densités d'ECM, et d'une composante aléatoire. Les cellules progressent dans le cycle cellulaire, adhèrent entre elles et avec la matrice extracellulaire, sécrètent des MMPs, et peuvent subir des mutations génétiques qui les protègent de l'apoptose et augmentent leurs capacités invasives. Ceci se traduit par une sécrétion accrue de MMPs, une capacité haptotactique accrue, et une diminution des coefficients d'adhésion. Les auteurs étudient ainsi l'impact de l'hétérogénéité de la masse tumorale sur les conformations obtenues, et mettent en évidence l'importance des forces d'adhésion inter-cellules et cellules-ECM.

Une pression de sélection a ensuite été intégrée au modèle (Anderson et al., 2006). Pour cela les auteurs ont modifié le mode de mutations des cellules, autorisant le passage aléatoire entre les différents stades d'agressivité au lieu d'une progression linéaire des stades les moins agressifs aux plus agressifs. Ils ont alors comparé l'évolution du modèle dans plusieurs types d'ECM plus ou moins homogènes, permettant de voir apparaître une dominance de certains phénotypes particulièrement invasifs dans un milieu hétérogène. Une réduction de la quantité d'oxygène disponible mène elle aussi à la sélection de clones ayant des traits agressifs, créant des tumeurs invasives.

L'adaptation de ce modèle pour intégrer des traits phénotypiques observés sur des lignées cellulaires mammaires épithéliales saines, transformées et cancéreuses a permis la simulation du comportement de ces cellules suivant les caractéristiques du milieu (Anderson et al., 2009). Les caractéristiques mesurées étaient le taux de prolifération, la capacité à dégrader l'ECM, la mobilité cellulaire et les forces d'adhésion entre cellules. Les simulations ont mis en évidence une meilleure adaptation des cellules cancéreuses à un milieu hypoxique et hétérogène, tandis que les cellules saines sont plus compétitives dans un milieu bien oxygéné.

On peut par ailleurs citer les travaux de Dormann et Deutsch, qui ont développé un automate cellulaire de type "lattice-gas" pour modéliser l'organisation spontanée des cellules au sein d'une tumeur avasculaire (Dormann et al., 2002). Ce type de formalisme considère qu'à une position donnée de la grille de simulation, plusieurs cellules peuvent coexister. On définit en effet à chaque nœud cinq canaux de vélocité, correspondant aux quatre directions de mouvement possibles, horizontaux et verticaux, dans une grille cartésienne, et à une position stationnaire. Chaque canal peut être occupé par au plus une cellule et la présence de plus d'une cellule sur un nœud accroit la pression locale. Les cellules peuvent alors migrer sous l'effet des gradients de pression, et sont chemotactiquement attirées par un facteur sécrété par les cellules nécrotiques. Les auteurs montrent ainsi l'apparition d'une structure en couches, avec un cœur nécrotique entouré par une strate de cellules quiescentes, elles-mêmes ceintes par des cellules proliférantes.

Alarcón *et al.* ont étudié l'effet de l'hétérogénéité du milieu sur le développement d'une tumeur (Alarcón et al., 2003). Pour cela un automate cellulaire décrivant la croissance de cellules cancéreuses a été couplé à un modèle de réseau vasculaire qui quadrille le milieu mais dont les vaisseaux sont irréguliers. Les auteurs ont alors pu considérer l'impact d'une source hétérogène de nutriments sur la croissance d'une tumeur primaire, mais aussi les patterns

d'invasion obtenus si des cellules cancéreuses sont disséminées aléatoirement au milieu de cellules saines. Ce modèle a ensuite été complexifié pour prendre en compte les interactions entre les cellules cancéreuses et la vasculature (Alarcón et al., 2005). En particulier, les cellules tumorales en apoptose sécrètent des facteurs angiogéniques (VEGF) qui modifient l'aspect du réseau vasculaire et ainsi la quantité d'oxygène diffusé. Owen *et al.* puis Perfahl *et al.* ont ensuite repris ce modèle pour décrire plus en détail l'angiogénèse induite par le VEGF respectivement en 2 dimensions ((Owen et al., 2009)) et 3 dimensions (Perfahl et al., 2011).

La croissance de sphéroïdes de cellules épithéliales in vitro a déjà fait l'objet de plusieurs efforts de modélisation. En 2006, l'équipe de Mark R. Grant a proposé un modèle discret des caractéristiques de la morphogénèse de cellules épithéliales dans différents types de cultures in vitro (Grant et al., 2006). Un automate cellulaire en 2D décrit l'évolution de cellules virtuelles de taille et de conformation fixes. Le comportement de chaque cellule est décrit par des règles déterministes appelées axiomes qui dépendent de l'occupation des sites limitrophes. Ce modèle a permis de simuler la croissance de sphéroïdes dans un milieu de culture 3D aussi bien que la formation de couches d'une cellule d'épaisseur à la surface de milieux de culture classiques. Les auteurs ont démontré la nécessité d'un phénotype polarisé pour l'émergence de structures organisées. Les résultats des simulations étaient alors comparables à des cultures de cellules MCF10A et MDCK (Madin-Darby canine kidney, ou cellules de rein canines), lesquelles, à l'image des MCF10A, forment des sphéroïdes d'une cellule d'épaisseur entourant un lumen vide quand elles sont cultivées dans le milieu 2D approprié.

Ce modèle a par la suite été utilisé pour analyser l'influence de l'orientation de la division cellulaire et de l'anoïkis (mort des cellules provoquée par la perte de contact avec la matrice extracellulaire)(Kim et al., 2009). Afin de réaliser une telle étude, des paramètres de probabilité ont été attribués aux axiomes provoquant l'anoïkis et la division cellulaire orientée. En faisant varier la valeur de la probabilité de la réalisation de ces axiomes quand leurs préconditions sont remplies, les auteurs ont montré que la perturbation de la division orientée crée des formes irrégulières tandis que la perturbation de l'anoïkis entraîne l'apparition de structures compactes, ayant un lumen envahi de cellules, qui ressemblent aux structures observées dans les tissus cancéreux.

Un formalisme complètement différent a été développé par l'équipe de Katarzyna A. Rejniak pour la description de la croissance de cellules MCF10A dans des cultures 3D (Rejniak et al., 2010). Leur modèle considère des cellules individuelles définies par une membrane élastique entourant un fluide décrit

par une équation de Navier-Stokes sur un domaine 2D "lattice-free". Les cellules subissent des changements phénotypiques dépendants de la distribution de récepteurs à leur surface. En effet, la position de chaque cellule au sein du cluster et vis-à-vis de la matrice extra-cellulaire est détectée via des récepteurs membranaires qui varient suivant la nature (cellule, matrice ou lumen) et l'état phénotypique des voisins. Par la modification de la sensibilité à un type particulier de récepteurs, les auteurs peuvent perturber le changement phénotypique associé. Ainsi, ils ont pu inhiber ou augmenter alternativement la division, la polarisation et la mort cellulaire, et étudier alors les processus cellulaires impliqués dans l'émergence de structures tumorales. Ils ont reproduit des observations expérimentales faites sur des cellules MCF10A normales et transformées cultivées in vitro.

L'équipe de Jonathan Tang a utilisé une approche de modélisation en 3D pour la formation de sphéroïdes de cellules MCF10A normales (Tang et al., 2011). Ils ont considéré une grille dodécahedronique, avec des domaines à 12 faces. Comme dans les travaux présentés ci-avant, chaque domaine peut être occupé par des cellules épithéliales, de la membrane basale ou du lumen. Ces agents subissent des modifications qui dépendent de leur position dans le cluster, suivant un jeu de règles déterministes. Les auteurs ont ainsi étudié l'importance de la polarisation et ont évalué les paramètres des potentiels de prolifération et d'apoptose sur la base de données expérimentales. Ils n'ont cependant pas pu trouver un jeu de paramètres permettant de reproduire des données sur cellules mutées.

Nous proposons ici un autre formalisme, basé sur un modèle computationnel cellule-centré de la morphogenèse de structures 3D organisées de cellules MCF10A normales et transformées. Pour ce faire, nous avons utilisé l'environnement de simulation CompuCell3D [1] qui permet la modélisation de cellules individuelles décrites comme des ensembles de domaines d'une grille carrée et dont le comportement est régit par des règles définies par le modélisateur. A l'inverse des modèles présentés plus haut, ce formalisme intègre une part stochastique, les mouvements des cellules étant définis par un algorithme de Monte Carlo, en fonction des variations induites de l'énergie globale du système. L'adaptation de l'environnement de simulation s'est fait par l'intégration de modules programmés en Python pour définir le comportement des différents phénotypes cellulaires, et les règles décrivant leur comportement.
Ce modèle est alors utilisé pour étudier les processus de formation de sphéroïdes de phénotype "sain" et de phénotype "muté" et ainsi indentifier les mécanismes mis en jeu.

1. www.compucell3d.org

5.2 Article : A computational model of HER2 over-expressing mammary epithelial cells spheroid formation in vitro

A computational model of HER2 over-expressing mammary epithelial cells spheroid formation in vitro

F. Lignet[a,b], A. Emde[c], E. Grenier[a,b], R. Merks[d]

[a] *Université de Lyon, 69003 Lyon, France; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Unité de Mathématiques Pures et Appliquées, CNRS, UMR5669, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France*

[b] *INRIA, Project-team NUMED, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France*

[c] *Department of Biological Regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100 Israel*

[d] *Centrum Wiskunde & Informatica, 1098 XG Amsterdam, The Netherlands; 4 Netherlands Institute for Systems Biology, Netherlands Consortium for Systems Biology; Mathematical Institute, Leiden University, Leiden, The Netherlands*

1. Introduction

Breast cancer is one of the most frequent deadly disease among women and is the most frequent cancer diagnosed on U.S. woman [1] It arouses from genetic mutations of mammary epithelial cells, inducing their uncontrolled proliferation and invasiveness. The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2, or ErbB2) is over-expressed in 20 to 30% of breast cancers, and is associated with a poor survival prognosis [2]. HER2 positive tumors show aggressive and invasive phenotypes. Treatments directed against this receptor or the downstream pathways are developed since about ten years but they show a low efficacy when used alone and some induce resistance after a few months [3].

In order to study cancerogenesis and invasion phenomena in breast cancer, mammary epithelial cell lines are often used *in vitro*. In particular, MCF10A, immortalized cell line extracted from human mammary tissue [4], form monolayer spheroid structures when grown in Matrigel. These are good model to reproduce the acini constituting lobular units at the end of ducts in adults breast, in which breast cancer generally occurs [5, 6].

Cells transformed to over-express HER2 form structures with patterns comparable to tumorigenic breast tissue. The cells organize in multiacinar clusters, which growth does not stabilize within two weeks, contrary to the normal structures. Furthermore, they are several cells thick, or even do not display any lumen [6, 7].

Such experimental devices permit to study closely the processes of morphogenesis of wild and mutated cells structures, but only on a morphologic point of view. It does not give insight on the involved cellular processes that may not be measurable in vitro. We propose to develop a modeling formalism that permit to study these processes by integrating individual cellular behaviors to generate multicellular spheroids. It would allow the identification of cellular mechanisms required for the morphogenesis of invasive structures.

Considering the nature of the system, a structure composed of a few dozens cells, a good approach is a cell-based modeling. In such a formalism, individual cells are simulated that behave depending on a fixed set of biophysical rules. It permits to describe precise cellular events such as, for example, polarization, progression in the cell cycle, phenotypic switches or intra-cellular adhesions.

Several models have already been developed to describe the growth of multi-cellular spheroids in vitro. In 2006, Grant *et al.* considered a discrete 2D model of epithelial cell growth [8] that highlighted the need for polarization in emergence of organized structures. This model has then been used to investigate the influence of anoikis (the death of the cells provoked by a loss of contact with the extracellular matrix) and oriented cell division [9]. In 2010 Rejniak *et al.* used a complex 2D agent-based biomechanical model to simulate spheroid formation and were able to reproduce experimental observations on wild and mutated MCF10A cell lines grown in vitro. [10]. A 3D modeling approach was used by Tang and coworkers to model normal MCF10A spheroid formation but they were unable to find a parameter set that permit to reproduce the growth of a modified MCF10A cell line [11].

We propose here a cell-based computational model of mammary epithelial cells clusters morphogenesis. We used CompuCell3D (CC3D), a simulation software based on the Cellular Potts Model (CPM), which was originally developed by Glazier and Graner [12, 13] to study cell sorting. This model has been extended and used to describe various processes such as tumor growth, angiogenesis, plant development, etc [14, 15, 16, 17]. CC3D is a modeling environment allowing to study cellular behavior with an already completely implemented CPM simulator [18, 19]. It permitted us to simulate the spatial organization of mammary epithelial cells whose phenotypic state change depending on their position in the cluster, driven by their contacts with their surrounding neighbors. Thanks to statistical analysis and comparison with experimental data, we were able to estimate the parameter values leading to the formation of wild-type spheroids. Then we identified the parameters changes leading to mutated cells structures. We could link theses changes to the modification of biological properties linked to the over-expression of

HER2. In particular, we determined that the formation of invasive, tumorigenic structures was driven by the disruption of cellular apoptosis and polarization and the increase of the proliferation.

The model was built based on experimental data. Normal and overexpressing HER2 MCF10A cells were grown in vitro in a 3D medium and shape measurements such as the lumen size and the compactness of the spheroid were taken.

2. Material and methods

2.1. In vitro experiments

The cell cultures were performed by Y. Yarden and A. Emde's team in the department of biological regulation of the Weizmann Institute of Science, Israel. MCF10A cells were first grown in monolayers in Dulbecco's modified Eagle's/F12 medium with 5% horse serum, 10μg/ml insulin, 0.1 μg/ml cholera toxin, 0.5 μg/ml hydrocortisone, 10 ng/ml EGF and 100 U/ml penicillin/streptomycin. Transfection and selection were performed to establish MCF10A-HER2 and MCF10A cells stably expressing green fluorescent protein. Cells were then trypsinized and re-suspended in MCF10A Assay Medium supplemented with 2.5 % Matrigel in eight-well chamber slides (BD Sciences) coated using 35 μl Matrigel. The medium was refreshed every 4 days.

In only 15 days, MCF10A cells form stable spheroids, in which the number of cells as well as the size of the structure does not change [20]. In the five first days, cells proliferate randomly. From day 5 to day 8, two subpopulations of cells appear : polarized cells with contact to the medium, and in inner subset of poorly polarized cells with no contact to the matrix [7]. From day 8, the inner non-polarized cells enter apoptosis [20]. A cell is said polarized when the surface molecules are not homogeneously spread. Three domains are identifiable depending on the receptors situated in theses regions: the apical domain, which is in contact with the lumen, characterized by an absence of receptor signalling; the lateral domains, in contact with other cells and bearing tight junctions molecules, desmosomes and/or cadherins ; and the basal domain, in contact with the extracellular matrix and contains ECM receptors, like integrins. These domains are then easily identifiable by confocal imaging, using the appropriate markers [21, 22].

Image analyses were performed using a self-written image analysis software and Priism Image Visualization Environment (www.msg.ucsf.edu/IVE/). Measures were made to characterize the shape of the spheroids : the area, the Core Factor which is the ratio between the lumen area and the spheroid area, and two compactness measures : the Cell to Hull ratio which is the ratio

between the area of the spheroid and the area of the convex shape enclosing it, and the Solidity computed as $Solidity = \sqrt{\frac{area/\Pi}{Perim/(2\Pi)}}$. More detail can be found in [23].

2.2. The Cellular Potts Model

The Cellular Potts model consider cells on a 2D or 3D lattice. The cells are defined by unique cell indexes (or spins) σ, so for each lattice site $\vec{x}$, a $\sigma(\vec{x})$ is associated depending on the cell the site belongs to. Types τ are also attributed to the cells, that describe their phenotypic state. Connections between cells are defined where adjacent lattice sites have unlike indexes $\sigma(\vec{x}) \neq \sigma(\vec{x}\,')$, a contact energy J is then defined, that depends on the types τ and τ' of the adjacent cells. The cells volume is constrained toward a target value $A_{target(\sigma)}$ with the use of a penalty λ. This permits to define the pattern's effective energy :

$$\begin{aligned} H = &\sum_{\vec{x},\vec{x}\,'} J(\tau(\sigma(\vec{x})), \tau(\sigma(\vec{x}\,')))(1 - \delta(\sigma(\vec{x}), \sigma(\vec{x}\,'))) \\ &+ \sum_{\sigma} \lambda_v (a(\sigma) - A_{target}(\sigma))^2 - \sum_{\sigma} \lambda_p \, \vec{p}(\sigma(\vec{x})) \cdot \vec{c} \end{aligned} \tag{1}$$

where $\vec{x}$ and $\vec{x}\,'$ are adjacent lattice sites ; σ the function associating an index to each lattice site and τ a cell type to each index ; $a(\sigma)$ the current area of the cell σ and $A_{target}(\sigma)$ its target area while λ_v is the cell resistance to compression; λ_p a coefficient, $v\vec{e}cp$ the polarization vector, and $\vec{c}$ the pixel copy vector. The absolute values of the contact energies J do not change the behavior of the simulation, only the relative strengths of the bounds impact the cell organization. We defined 3 levels of bound strengths : favorable, neutral and unfavorable. Contacts between cells of the same type τ are favorable, as well as contact between outer and polarized cells, and between lumen, inner and apoptotic cells. The bounds between the medium and the three interior types : inner cells, apoptotic cells and lumen, are unfavorable. All other cells contacts are then considered as neutral.

At each Monte Carlo Step, the algorithm attempts $\mathcal{N}$ ($\mathcal{N}$ being the number of pixels in the lattice) spin changes between two adjacent pixels to mimic the amoeboid cell motility, defined as elongations and retractions of pseudopods. At each spin switch attempt, the resulting effective energy change ΔH is computed. The switch is then accepted with the probability $P(\Delta H)$

$$P(\Delta H) = \{e^{-\Delta H/kT}, \Delta H \geq 0; 1, \Delta H < 0\}, \tag{2}$$

where T is the intrinsic cell motility. In our simulations, we fixed the value of T to 10.

When cells enter a proliferating stage, their target volume is doubled, causing their volume to increase progressively. Once the target value is reached, the cell divides in two daughters to which a unique spin σ is attributed.

To adapt the CPM to the MCF10A growth, we defined 5 types of cells that represent their phenotypic state : outer, inner, polarized, apoptotic and lumen. Variations between types are driven by cell contacts lengths as described in section 3.1, and the contact energy between two cells depends on the phenotypic state of the cells involved. When a cell enters apoptosis, its target volume is set to zero, and the target volume of the lumen is increased of the previous volume of the dying cell. Once a cell changes to the polarized phenotype, we attribute it an axis perpendicular to the tangent to the lumen, along which the cell will divide.

The 2D lattices simulated by CompuCell3D were transformed to .png images using first a python script. We computed the shape criteria on these images with the Matlab's Image Processing Toolbox, and analyzed the resulting data with Matlab Statistics Toolbox. A single spheroid growth simulation takes less than 10 minutes on a standard laptop with a 2.66 GHz dual Core processor.

2.3. Methodology

The building of the model was made following certain steps. First we estimated the 8 contact lengths thresholds that condition the passage from one phenotypic state to another. To do so, we randomly generated 200 sets of parameters values, generated the corresponding simulations and performed a sensitivity analysis of the parameters towards the shape indexes measured on the virtual spheroids. It permitted to identify the most important of them and estimate appropriate values.

Then we investigated the emergence of invasive phenotypes through the modification of the proliferation, polarization and apoptosis potentials. We randomly generated 200 sets of of values for the probabilities for a cell to enter each of these cellular processes when the contact conditions, as defined by the 8 thresholds, are met. Simulations were executed and the indexes shapes measured to performed a sensitivity analysis toward the three probabilities. These steps are summarized in the figure 1.

3. Results

3.1. Model building

We model the spheroid formation from a single MCF10A cell using the simulation software CompuCell3D (www.compucell3d.org/). This software is based on the Glazier-Graner-Hogeweg model (also called Cellular Potts model) [12, 13, 24], where cells are represented as connected domains of lattice points. At each time step, to represent amoeboid cell motility, the algorithm attempts to randomly extend or retract the domains. The acceptance probability of these attempts depends on the adhesive interactions with surrounding cells and the extracellular matrix, and on a parameter that represents the intrinsic cell motility (more computational details can be found in the section 2.2). Cells properties such as adhesion, proliferation rate, or growth rate can be defined by the modeler. In our case, to model the cell proliferation, organization and take into account the modifications that the cells will undergo, we choose to distinguish several "types" of cells, that represent their phenotypic state and depend on their position in the cluster : outer, inner, apoptotic and polarized. In CompuCell, every pixel that does not belong to a type-defined cell is referenced as "Medium" which in our simulation represents the embedding matrix used in the in vitro protocol.

The cells behavior is mainly defined based on the contacts in-between them and with the lumen and the medium. To access these contacts, for each cells, we consider the surface, i.e. the external pixels of the cluster, and computed the fraction of it in contact with the various types of neighbors. Its known in the literature that the proliferation of cells is mainly driven by the existence of a contact with the ECM, and that either the polarization or the apoptosis of cells is triggered by contacts all together with the ECM, others epithelial cells and the lumen [21, 22]. To represent it, we defined the parameters and behavior rules presented below.

Our model is based on height parameters V_1 to V_8. V_1 is the minimum fraction of an outer cell surface in contact with the medium that is needed for it to enter proliferation. V_2 to V_4 are respectively the minimums of cell surface in contact with other outer cells or polarized cells(V_2), in contact with the medium (V_3), and in contact with inner cells (V_4), that are required for an outer cell to enter proliferation. V_5 is the minimum fraction of a polarized cell surface in contact with the medium that is needed for it to enter proliferation. V_6 to V_8 are respectively the minimums of cell surface in contact with other outer cells or polarized cells(V_6), in contact with the medium (V_7), and in contact with inner or apoptotic cells (V_8), that are required for a polarized cell to enter proliferation.

The evolutions of the cellular automata is then defined by the following set of rules (also illustrated by fig. 2, starting from one outer cell :

- An outer cell can :
  - proliferate if the surface in contact with the medium is above a value V_1,
  - polarize if the surface in contact with the medium (basal domain) is above a value V_2, the surface in contact with other outer cells or polarized cell is above a value V_3 and the surface in contact with inner cells (potential apical domain) is above V_4,
  - become an inner cell if it has no contact with the medium.
- A polarized cell can :
  - proliferate if the surface in contact with the medium is above a value V_5 and its has a non zero contact with inner cells,
  - be stabilized if the surface in contact with the medium is above a value V_6, the surface in contact with other outer cells or polarized cells is above a value V_7 and the surface in contact with inner or apoptotic cells (apical domain) is above V_8,
  - become an inner cell if it has lost contact with the medium.
- An inner cell enters apoptosis if it loses contact with outer cells or potentially proliferative polarized cells

The stabilization of a polar cell definitively prevents its proliferation even if the neighboring conditions are met. The axis of division of proliferative inner cell is randomly taken, whereas the polarized cells divide along the axis defined by the line passing through the center of mass of this cell and the barycenter of the centers of mass of the neighboring inner cells. This way a polarized cell divide orthogonally to the lumen. Every space left empty the death of inner cells is replaced by lumen. The lumen is then represented as a single entity whose volume corresponds to the sum of the volumes of every apoptotic cells before death.

To investigate the influence of proliferation, polarization and apoptosis on the morphogenesis of the multi-cellular structure, we added a random part to the state transitions : once the neighboring conditions are reached for a cell to switch of phenotypic state, the fulfillment of the change is decided by a Bernoulli trial of probability p (fig. 2). These probabilities are fixed to

0.5 for the parametrization of the model for normal MCF10A cells spheroid growth. To simulate variations and analyze the emergence of complex pattern, modifications of the three probabilities of enter apoptosis, polarization or proliferation would be used.

3.2. Parametrization for normal growth

To investigate the influence of proliferation, polarization and apoptosis on emergence of invasive phenotype, we first have to parametrize the model to reproduce the growth of a spheroids composed of normal MCF10A cells, as illustrated in fig. 3

In our model, transformations of cells from one phenotypic state to an other and their entrance in the processes of proliferation, polarization and apoptosis are conditioned by the 8 contact lengths with their neighbors and the surrounding medium as defined in the section 3.1. In order to find the values of the parameters that permit to reproduce the growth of normal cells spheroids in 3D medium, we randomly selected 200 sets of 8 values in the whole parameter space. For each parameter set, 10 simulations were performed, to offset the stochasticity of the CPM algorithm, and the shape criteria presented section 1 were computed. In our simulations as well as in the experimental data, the two compactness criteria, CTH and Solidity were strongly correlated. For simplicity of interpretation, we will only consider the CTH in the following, considering that no more information was brought by the Solidity. To assess the correctness of our simulations, we compared the relation between the shape criteria measured on the computational spheroids and the relation the ones measured on the in vitro experiments. The results are presented Figure 4.

We observed that a large part of our simulations did not overlap the experimental data (in particular on the right hand of fig. 4, the simulated area are far larger than the observations), so we investigate the parameter space to find value that permit to fit more closely to the experiments. We performed a sensitivity analysis to assess the importance of each contact parameter towards the spheroid shape indexes (see fig. 5). We can see that the two most important are the surfaces in contact with the medium required by polarized and outer cells to enter a proliferative phenotype (V_1 and V_5). So the spheroid formation is mainly driven by the ability of cells to proliferate when they sense that there is medium nearby them, or in other words, free space inhabitable by potential new cells. But it is hard to decide from this analysis what is the appropriate value for each parameter since some of them have contradictory effects on shape indexes. For example, the V_5 is negatively correlated to the CoreFactor, and positively correlated with the CTH. Which means that for a high value of V.5, a cell will require a large contact with the

medium to enter the proliferating stage. It will lead to circular shapes (high CTH), but with a small lumen (low CoreFactor). And yet we want both of these indexes, CTH and CoreFactor, to be high, since we want a spheroid with a circular shape (CTH close to 1) and with a clearly apparent lumen (CoreFactor at least 0.5). So variations of other parameters were used to achieve such an equilibrium between the two criterion.

Eventually, we found a parameter set able to reproduce the growth of MCF10A cell observed in vitro (fig. 6.).

3.3. Parametrization for mutated morphogenesis

We made the hypothesis that the overexpression of HER2 receptors does not modify the repartition of the other kind of receptors at the surface of the cells. So the way cells sense their neighborhood is unchanged. But the HER2+ mutation has an impact on the dynamic of the intracellular molecular pathways, so the cells may not respond the same way to the external stimuli. That is why , we considered that HER2+ mutation modify the response of the cells in terms of entrance in the various phenotypic states when the external contacts authorize them. So we chose to consider only probabilities of cells to enter a different phenotypic state once the contact conditions required are met. Three parameters are then examined : the probabilities to enter apoptosis, to enter proliferation and to polarize. We generated 200 random sets of 3 values for these parameters to cover the whole parameter space, ran 10 simulations for each set, and measured the shape criteria. A sensitivity analysis of the importance of the probabilities towards the shape measures were performed and it appeared that all three of them impact on the area, the lumen size and the compactness of the spheroids (fig. 7). So to retrieve a mutated shape, it must be necessary to modify the 3 probabilities.

As a verification, we performed simulations, making the probabilities vary one by one, and then by changing two of the three probabilities. The simulation results are presented on fig. 8

These modifications leads to variations of the final spheroid shape, but we really go close to the mutated form when the three probabilities are modified at the same time, as compared to the experimental images in the fig. 9. It is really interesting to see that we retrieve the observations described by Hebner et al. who highlighted the importance of the three processes in the formation of normal and mutated epithelial cells 3D structures [25].

4. Discussion

We simulated the growth of normal mammary epithelial cell spheroid formation in vitro with a computational model based on the Glazier-Graner-Hogeweg model. We identified and estimated the most important contact lengths thresholds conditioning the behavior of the model. Then we investigated the cellular processes involved in the emergence of irregular and compact shapes comparable to over-expressing HER2 mammary epithelial cell clusters grown in vitro. Thanks to a sensitivity analysis on the probabilities of the cells to undergo a phenotypic switch, we showed that the processes of proliferation, polarization and apoptosis are all of the same importance for the formation of mutated patterns.

The link between HER2 over-expression and both modification of cellular proliferation, disruption of polarization and resistance to apoptosis can explain the resistance observed in patient treated by target treatments, the blockade of one of these processes being not enough to disrupt cancer progression. This highlight the importance to target all three mechanisms in a therapeutic strategy against HER2+ breast cancer.

Our results are consistent with the literature describing the growth of normal and over-expressing HER2 MCF10A cells in vitro. Hebner *et al.* reviewed the processes needed to obtain a normal spheroid formation [25] : a controlled proliferation, localized apoptosis events and external cells polarization and highlighted that these processes were impaired in mutated cells, leading to sprouting structures with filled lumen. Moreover, it is consistent with findings made on the cell-based models that have been previously used to describe the formation of spheroids from mammary epithelial cells and study the importance of proliferation, polarization and cellular death [8, 9, 10, 11].

The 2D cellular automaton developed by Grant *et al.* ([8]) describes the evolution of fixed size and fixed shape cells on an hexagonal grid and is able to reproduce the growth of epithelial cells in different culture conditions (growth of spheroids in a 3D medium as well as the formation of one cell thick layers on top of a 2D medium). The cells behavior is dictated by a set of deterministic rules that depend on the occupancy of the neighboring sites. The authors showed that a polarized phenotype was necessary for the emergence of organized structures.

This model has been extended to investigate the influence of anoikis and oriented cell division by varying the probabilities of such processes to occur

[9]. The authors showed that the disruption of anoikis leads to compact filled structures, while the disruption of oriented cell division creates irregular shapes that resemble cancerous tissues.

Rejniak *et al.* used a completely different formalism to describe the growth of MCF10A cells in 3D cultures [10]. Their model consider individual cells defined by an elastic membrane in a 2D lattice-free domain. Phenotypic states are attributed to the cells depending on the distribution of receptors at their surface that act as sensors of the position of the cell in the cluster. By modifying the sensitivity to a particular type of membrane receptors, the authors can disrupt the associated phenotypic change and so alternatively inhibit or increase cell division, polarization and death. They highlighted the importance of the three processes in wild and mutated MCF10A structures formation.

Tang and coworkers utilized a 3D approach to model normal MCF10A spheroid formation [11]. They consider a dodecahedron lattice, with 12 faces domains that can be filled either by epithelial cells, basement membrane or lumen. Agents undergo modifications depending on their position in the cluster, following a set of deterministic rules. The authors showed that even if polarization is not necessary for the emergence of a lumen, it is required to obtain a spheroid which is composed of a one cell thick layer. But they were unable to find a parameter set that permit to reproduce the growth of a modified MCF10A cell line.

Our model was inspired by the model developed by Rejniak *et al.* [10], notably we used similar distinctions between the phenotypic states of the cells, and used rules based on the contacts in-between cells to regulate the switches from one state to the other. But our model runs on simpler hypotheses : we do not consider contact molecules at the surface of the cells, used to create bond between membranes, we considered only forces of attractions, defined as contact energies between cells. Rejniak's model is based the Navier-Stokes equation of a viscous incompressible fluid with a given velocity on a cartesian grid. Forces are applied on the cells boundaries that represent the contractile, elastic and cell to cell forces. Boundaries move along with the fluid that locally expand if cells are growing. Such a model requires a long computational time (at least 20h on a single processor Mac Pro desktop computer), while ours, much simpler, needs only 10 minutes [26, 27, 10].

An other interesting point is the possibility offered by the software CC3D to integrate a model of the intracellular signaling pathways of HER2. It would permit to investigate more precisely the link between the receptor and the cellular mechanisms. Data from in vitro spheroids treated with drugs

targeting particular key molecules of the pathways would allow to infer their respective role in the triggering of the phenotypic changes. For this work, we chose to consider 2D simulations, that allows a much faster computation time and so permit to run a large number of simulation for parameter analyses, but the model can be simulated in 3D within the CC3D environment.

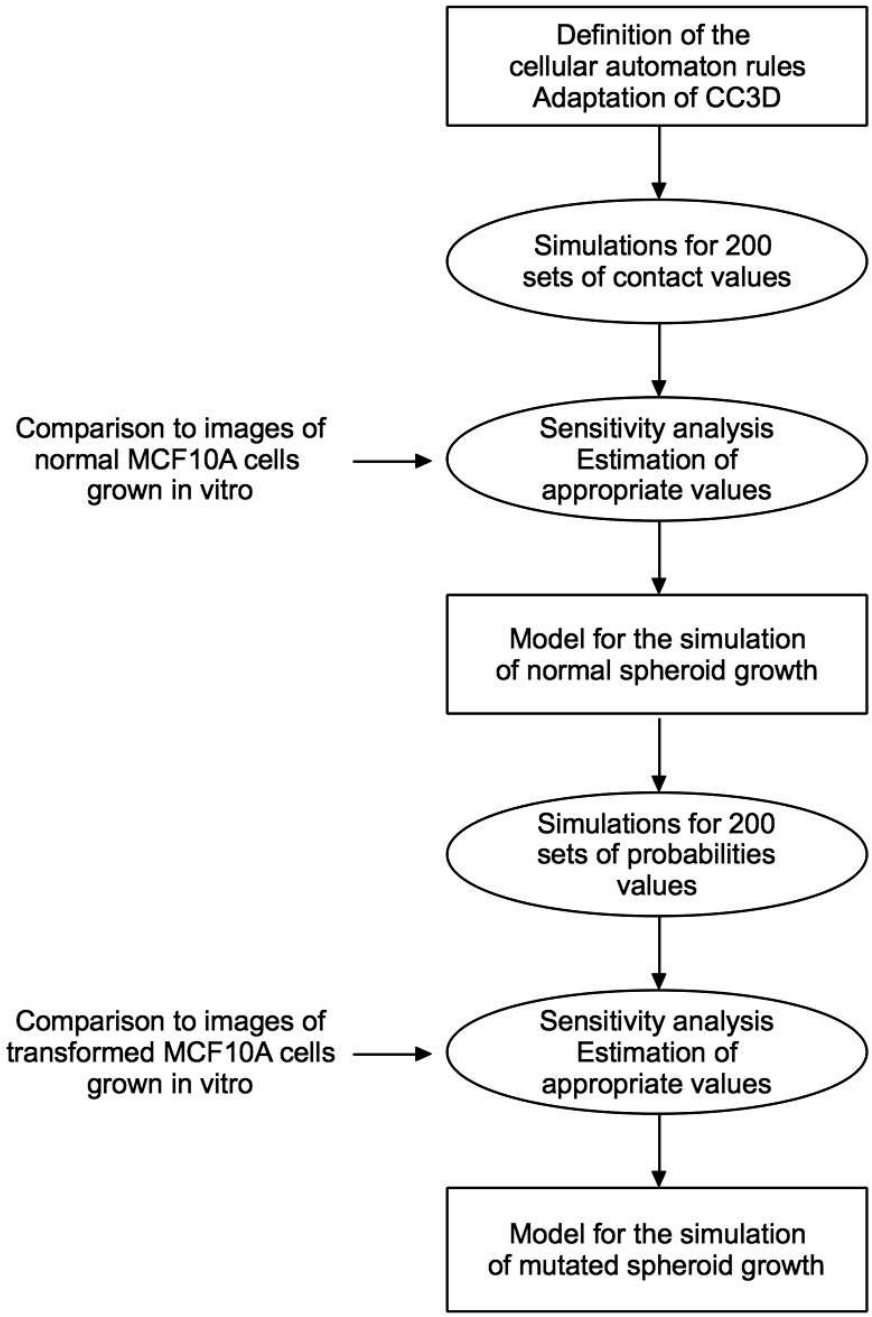

Figure 1: Schematic view of the steps of the model building and parametrization towards in vitro observations.

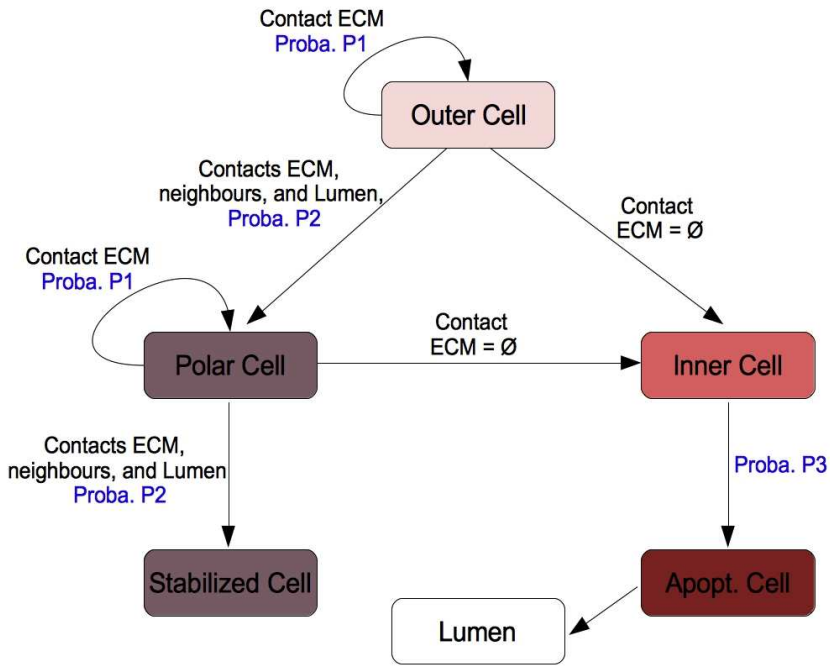

Figure 2: Schematic view of the model rules.

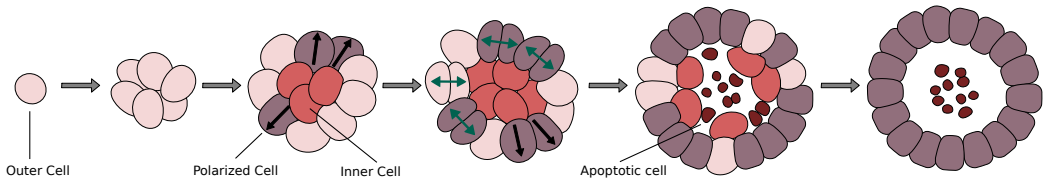

Figure 3: Schematic view of spheroid formation. Pink : outer cells, purple: polarized cells, red : inner cells, brown : apoptotic cells. For clarity reasons, the lumen "cell" is not represented.

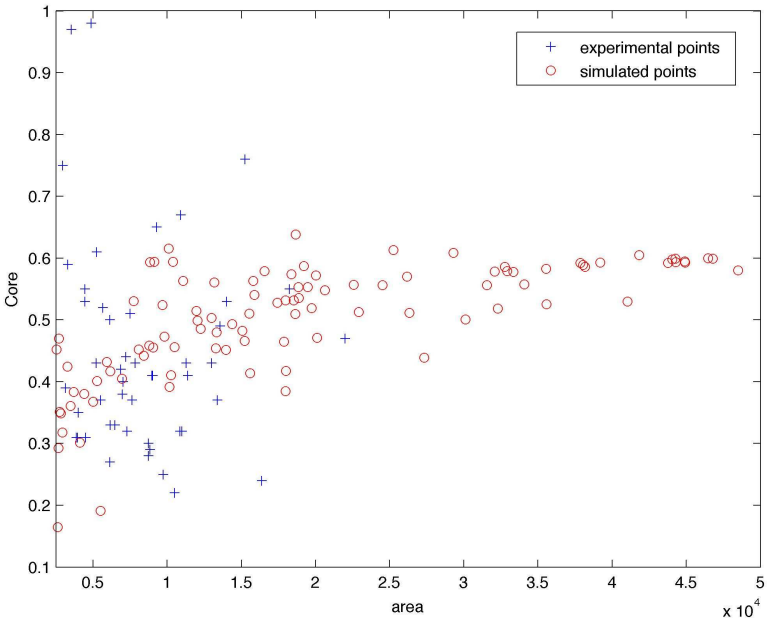

Figure 4: Comparison of the shape measurements on in vitro experiments and spheroids simulated from 200 random parameter sets.

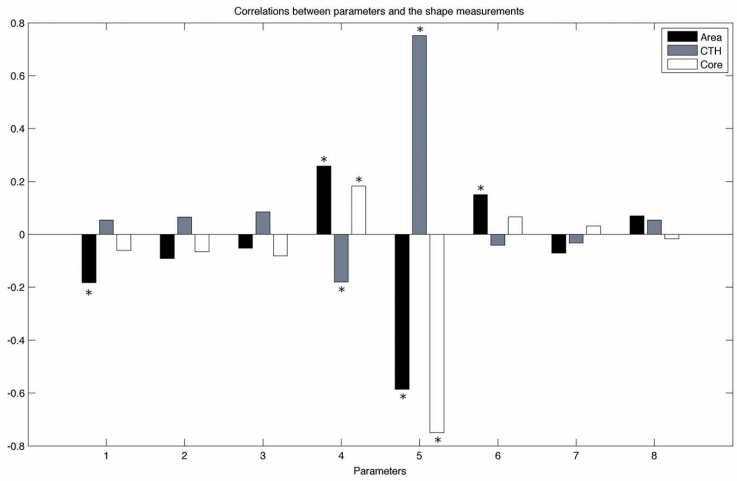

Figure 5: Sensitivity analysis of the parameters defining the contacts lengths needed to change phenotypic state towards the shape criteria.

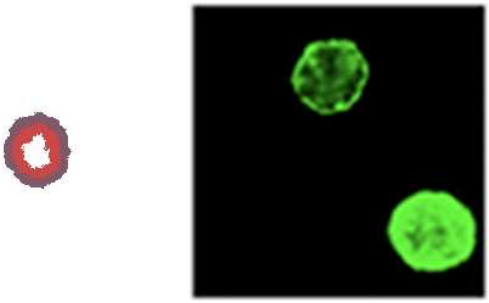

Figure 6: Comparison of the simulated spheroid (left) to the images obtained in vitro (right)

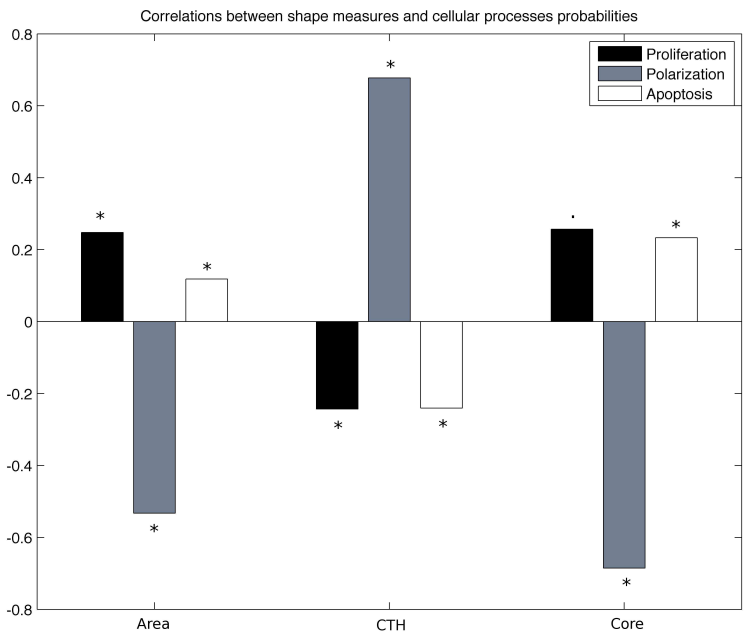

Figure 7: Sensitivity analysis of the probabilities to trigger a given cellular process towards the shape criteria.

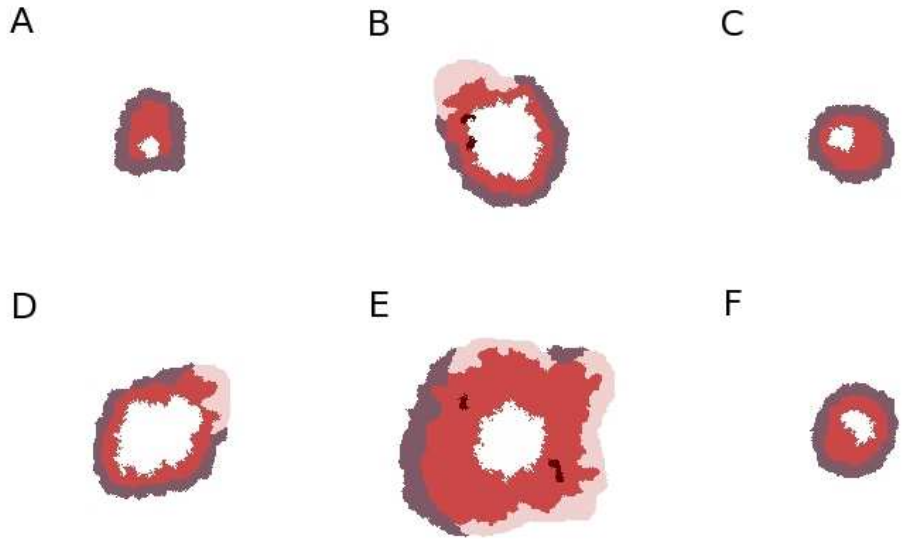

Figure 8: Simulations of spheroid growth made with the variation of the probabilities one by one : (A) proliferation, (B) polarization, (C) apoptosis ; or with the variation of couples of probabilities : (D) proliferation and polarization, (E) polarization and apoptosis, (F) proliferation and apoptosis. Only the couple polarization+apoptosis permits to retrieve a phenotype close to the mutated phenotype observed in vitro.

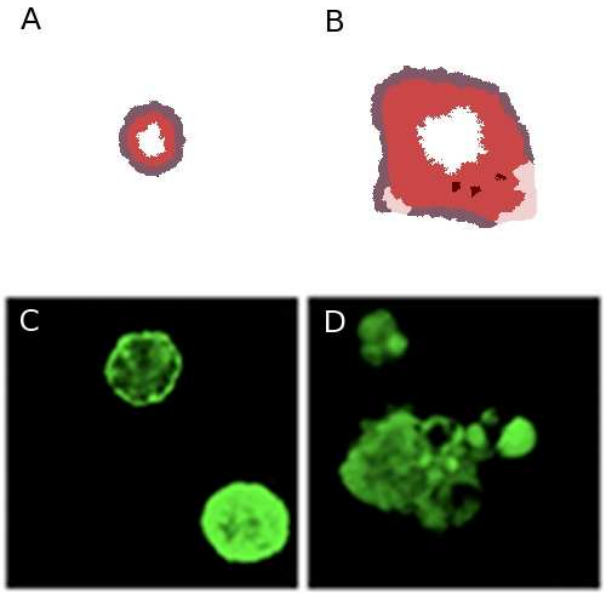

Figure 9: Simulations of spheroid growth in normal conditions (A), and in mutated conditions (B)

[1] American Cancer Society. *Cancer facts & figures*. Atlanta : American Cancer Society, 2012.

[2] D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire. A computational study of the development of epithelial acini: Ii. necessary conditions for structure and lumen stability. *Science*, 9:177–182, 1987.

[3] P. Morrow, F. Zambrana, and F. Esteva. Recent advances in systemic therapy: Advances in systemic therapy for her2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 11(4):207, 2009.

[4] H.D. Soule, T.M. Maloney, S.R. Wolman, W.D. Peterson, R. Brenz, C.M. McGrath, J. Russo, R.J. Pauley, R.F. Jones, and SC Brooks. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, mcf-10. *Cancer research*, 50(18):6075, 1990.

[5] O.W. Petersen, L. Rønnov-Jessen, A.R. Howlett, and M.J. Bissell. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19):9064, 1992.

[6] S.K. Muthuswamy, D. Li, S. Lelievre, M.J. Bissell, and J.S. Brugge. Erbb2, but not erbb1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature Cell Biology*, 3(9):785, 2001.

[7] J. Debnath, K.R. Mills, N.L. Collins, M.J. Reginato, S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, 111(1):29–40, 2002.

[8] M.R. Grant, K.E. Mostov, T.D. Tlsty, and C.A. Hunt. Simulating properties of in vitro epithelial cell morphogenesis. *PLoS computational biology*, 2(10):e129, 2006.

[9] S.H.J. Kim, J. Debnath, K. Mostov, S. Park, and C.A. Hunt. A computational approach to resolve cell level contributions to early glandular epithelial cancer progression. *BMC systems biology*, 3(1):122, 2009.

[10] K.A. Rejniak, S.E. Wang, N.S. Bryce, H. Chang, B. Parvin, J. Jourquin, L. Estrada, J.W. Gray, C.L. Arteaga, A.M. Weaver, et al. Linking changes in epithelial morphogenesis to cancer mutations using computational modeling. *PLoS Computational Biology*, 6(8):e1000900, 2010.

[11] J. Tang, H. Enderling, S. Becker-Weimann, C. Pham, A. Polyzos, C.Y. Chen, and S.V. Costes. Phenotypic transition maps of 3d breast acini obtained by imaging-guided agent-based modeling. *Integr. Biol.*, 3(4):408–421, 2011.

[12] F. Graner and J.A. Glazier. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69(13):2013–2016, 1992.

[13] J.A. Glazier and F. Graner. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E*, 47(3):2128, 1993.

[14] D. Drasdo and S. Höhme. Individual-based approaches to birth and death in avascu1ar tumors. *Mathematical and Computer Modelling*, 37(11):1163–1175, 2003.

[15] A. Shirinifard, J.S. Gens, B.L. Zaitlen, N.J. Popławski, M. Swat, and J.A. Glazier. 3d multi-cell simulation of tumor growth and angiogenesis. *PLoS One*, 4(10):e7190, 2009.

[16] N.J. Savill and R.M.H. Merks. The cellular potts model in biomedicine. *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*, pages 137–150, 2007.

[17] R.M.H. Merks, M. Guravage, D. Inzé, and G.T.S. Beemster. Virtualleaf: an open-source framework for cell-based modeling of plant tissue growth and development. *Plant physiology*, 155(2):656–666, 2011.

[18] JA Izaguirre, R. Chaturvedi, C. Huang, T. Cickovski, J. Coffland, G. Thomas, G. Forgacs, M. Alber, G. Hentschel, SA Newman, et al. Compucell, a multi-model framework for simulation of morphogenesis. *Bioinformatics*, 20(7):1129, 2004.

[19] T.M. Cickovski, C. Huang, R. Chaturvedi, T. Glimm, H.G.E. Hentschel, M.S. Alber, J.A. Glazier, S.A. Newman, and J.A. Izaguirre. A framework for three-dimensional simulation of morphogenesis. *Computational Biology and Bioinformatics, IEEE/ACM Transactions on*, 2(4):273–288, 2005.

[20] J. Debnath, S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge. Morphogenesis and oncogenesis of mcf-10a mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 30(3):256–268, 2003.

[21] L.E. O Brien, M.M.P. Zegers, and K.E. Mostov. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7):531–537, 2002.

[22] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, et al. *Molecular biology of the cell, 4th edition*, chapter Membrane structure. Garland Science, 2002.

[23] A. Emde, CR Pradeep, DA Ferraro, N. Ben-Chetrit, M. Sela, B. Ribba, Z. Kam, and Y. Yarden. Combining epitope-distinct antibodies to her2: cooperative inhibitory effects on invasive growth. *Oncogene*, 30(14):1631–1642, 2010.

[24] R.M.H. Merks and J.A. Glazier. A cell-centered approach to developmental biology. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 352(1):113–130, 2005.

[25] C. Hebner, V.M. Weaver, and J. Debnath. Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3:313–339, 2008.

[26] K.A. Rejniak and A.R.A. Anderson. A computational study of the development of epithelial acini: I. sufficient conditions for the formation of a hollow structure. *Bulletin of Mathematical Biology*, 70(3):677–712, 2008.

[27] K.A. Rejniak and A.R.A. Anderson. A computational study of the development of epithelial acini: Ii. necessary conditions for structure and lumen stability. *Bulletin of mathematical biology*, 70(5):1450–1479, 2008.

Chapitre 6

Discussion

Des progrès incontestables ont été faits dans le traitement et la prise en charge des patients en oncologie ces dernières années. Cela a entraîné une diminution de la mortalité pour plusieurs types de cancers. Cependant, le nombre annuel de nouvelles molécules anti-cancéreuses obtenant l'autorisation de mise sur le marché est de plus en plus faible. Le processus même du développement thérapeutique tel qu'il est opéré dans les grandes entreprises du médicament souffre d'un manque crucial d'efficacité. Les autorités et les agences de régulation ont récemment indiquées le rôle fondamental que pourraient jouer les activités de modélisation et simulation dans l'amélioration du rendement du développement thérapeutique. C'est dans ce contexte général que nous souhaitons ancrer nos travaux. En partant de l'état de l'art sur les modèles mathématiques relativement simples et empiriques développés dans le passé, nous proposons un approche de modélisation mathématique multi-échelle dont le but est d'offrir une plateforme computationnelle permettant l'intégration de plus de connaissance et de plus de données sur la maladie étudiée.

Dans un premier travail, nous avons considéré un modèle continu multi-échelles pour représenter la croissance de tumeurs colorectales et l'angiogenèse concomitante, intégrant un modèle des voies de signalisation du VEGF. L'action de traitements anti-angiogéniques et de chimiothérapies a été modélisée et des simulations ont permis d'identifier un protocole optimal de combinaison des deux traitements.

Dans une deuxième étude, un modèle discret, cellule-centrée a été développé pour simuler la morphogénèse de sphéroïdes de cellules épithéliales mammaires humaines tels qu'observés lorsque ces cellules sont cultivées in vitro dans un milieu approprié. Ce modèle a permis d'identifier les processus cellulaires impliqués dans la formation de structures irrégulières, au lumen rempli, associés

à une surexpression du récepteur HER2.

Les choix des deux formalismes mathématiques, discret et continu, a été fait pour s'adapter aux problématiques auxquelles ils ont été respectivement appliqués. Le formalisme continu permet une vision d'ensemble de la masse tumorale et de sa dynamique en tant que tissu, tout en permettant l'intégration de mécanismes d'échelle inférieure. Une description cellule par cellule serait beaucoup trop coûteuse en terme de temps de calcul, et n'apporterait aucune information supplémentaire. Par ailleurs la modélisation des voies moléculaires du VEGF par un système d'équations différentielles permet une approche quantitative de la dynamique du réseau de signalisation. Dans le cas d'un système impliquant un nombre restreint de cellules, la formation de sphéroïdes, l'aspect discret permet de décrire le comportement individuel des cellules et leur arrangement les unes vis-à-vis des autres, ce qui serait difficilement réalisable avec un modèle continu.

Pour les deux modèles, continu et discret, un même défi s'est présenté : l'identifiabilité et l'estimation des paramètres. Dans le cas du modèle continu, nous avons utilisé des données d'expérience pour calibrer le modèle. En pratique, la plupart des valeurs des paramètres ont alors été extraites de la littérature quand cela était possible, et fixées arbitrairement quand cela ne l'était pas. Cette complexité rend délicate toute tentative de validation des modèles. En effet, comment s'assurer de leur pertinence au-delà d'une simple comparaison de résultats de simulations à un jeu de données expérimentales isolé ? Nos modèles sont basés sur un très grand nombre de paramètres, dont l'estimation simultanée est impossible au vu du petit nombre de données expérimentales à mettre en regard, et de la difficulté rencontrée pour les obtenir. Quel est l'impact sur la qualité de la prédiction du large nombre de paramètres estimés arbitrairement relativement à ceux extraits ou estimés à partir de données expérimentales ? De même, comment s'assurer que les valeurs trouvées dans la littérature sont justes et pertinentes ?

Une solution pour surmonter ces différents problèmes est la construction d'un modèle complexe, multi-niveaux, bloc après bloc. Chaque entité du modèle (les réseaux moléculaires, les processus cellulaires, les dynamiques tissulaires) pourrait être développée individuellement et validée sur la base de données expérimentales adaptées (par exemple, respectivement, des données biochimiques de vitesse d'interactions moléculaires, des résultats de tests mécanophysiques sur des cultures in vivo de cellules tumorales, et des mesures d'anatomopathologie sur des tissus cancéreux). La construction du modèle complexe se-

rait alors l'assemblage des blocs dont la pertinence a été établie séparément. C'est l'approche que nous avons cherché à appliquer lors de la construction du modèle continu multi-échelles, en développant un modèle autonome des voies de signalisation du VEGF. L'approche de construction blocs par blocs pose néanmoins d'autres questions. Par exemple, comment s'assurer que le lien, essentiellement artificiel, qui est fait entre les différentes échelles de modélisation reflète la réalité biologique ? Il est en effet délicat de décrire mathématiquement les interactions entre mécanismes moléculaires et mécanismes cellulaires, de grandes différences de vitesse et d'échelle spatiale séparant les deux.

Dans ce travail, nous avons démontré, par deux approches différentes, le potentiel des formalismes multi-échelles comme voie de perspectives dans les activités de modélisation et simulation dont le but est d'améliorer le processus du développement thérapeutique. Nous nous sommes limités à développer deux exemples particuliers sans toutefois réellement adresser les questions méthodologiques que pose ce type de modélisation, en particulier en ce qui concerne la validation des modèles. Ces questions devront être traitées afin de faire de cette approche une réelle voie prometteuse dans l'optimisation des traitements des cancers.

Table des figures

1.1 Les sept caractéristiques d'une cellule cancéreuse 9
1.2 Représentation schématique du processus d'angiogénèse tumorale 12
1.3 Hyperplasie, dysplasie et invasion locale 14
1.4 Représentation schématique de l'évolution de la croissance tumorale 16
1.5 Rôle pressenti des activités de modélisation et simulation dans le développement du médicament 19
1.6 Importance de l'information dynamique pour évaluer l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux 22
1.7 Vision multi-échelles de la modélisation 25

3.1 Représentation schématique du modèle continu multi-niveaux . 46

Bibliographie

Alarcón, T., Byrne, H., and Maini, P. (2003). A cellular automaton model for tumour growth in inhomogeneous environment. *Journal of Theoretical Biology*, 225(2) :257–274.

Alarcón, T., Byrne, H., and Maini, P. (2005). A multiple scale model for tumor growth. *Multiscale Modeling and Simulation*, 3(2) :440.

Aldridge, B., Burke, J., Lauffenburger, D., and Sorger, P. (2006). Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nature cell biology*, 8(11) :1195–1203.

Alves, R., Antunes, F., and Salvador, A. (2006). Tools for kinetic modeling of biochemical networks. *Nature biotechnology*, 24(6) :667–672.

Anderson, A. (2005). A hybrid mathematical model of solid tumour invasion : the importance of cell adhesion. *Mathematical Medicine and Biology*, 22(2) :163–186.

Anderson, A., Chaplain, M., Newman, E., Steele, R., and Thompson, A. (2000). Mathematical modelling of tumour invasion and metastasis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2(2) :129–154.

Anderson, A., Hassanein, M., Branch, K., Lu, J., Lobdell, N., Maier, J., Basanta, D., Weidow, B., Narasanna, A., Arteaga, C., et al. (2009). Microenvironmental independence associated with tumor progression. *Cancer research*, 69(22) :8797.

Anderson, A., Weaver, A., Cummings, P., and Quaranta, V. (2006). Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*, 127(5) :905–915.

Arakelyan, L., Vainstein, V., and Agur, Z. (2002). A computer algorithm describing the process of vessel formation and maturation, and its use for predicting the effects of anti-angiogenic and anti-maturation therapy on vascular tumor growth. *Angiogenesis*, 5(3) :203–214.

Bergers, G., Benjamin, L., et al. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3 :401–410.

Billy, F., Ribba, B., Saut, O., Morre-Trouilhet, H., Colin, T., Bresch, D., Boissel, J., Grenier, E., and Flandrois, J. (2009). A pharmacologically based multiscale mathematical model of angiogenesis and its use in investigating the efficacy of a new cancer treatment strategy. *Journal of Theoretical Biology*, 260(4) :545–562.

Bissell, M. and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nature Reviews. Cancer*, 1(1) :46.

Breward, C., Byrne, H., and Lewis, C. (2002). The role of cell-cell interactions in a two-phase model for avascular tumour growth. *Journal of Mathematical Biology*, 45(2) :125–152.

Byrne, H. and Chaplain, M. (1995). Growth of nonnecrotic tumors in the presence and absence of inhibitors. *Mathematical biosciences*, 130(2) :151–181.

Byrne, H. and Chaplain, M. (1996). Growth of necrotic tumors in the presence and absence of inhibitors. *Mathematical biosciences*, 135(2) :187–216.

Chaplain, M. (1996). Avascular growth, angiogenesis and vascular growth in solid tumours : The mathematical modelling of the stages of tumour development. *Mathematical and computer modelling*, 23(6) :47–87.

Chaplain, M., Macklin, P., McDougall, S., Anderson, A., Cristini, V., and Lowengrub, J. (2010). Multiscale mathematical modeling of vascular tumor growth. *Multiscale Cancer Modeling*, 34 :253.

Chaplain, M., McDougall, S., and Anderson, A. (2006). Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8 :233–257.

Chaplain, M. and Stuart, A. (1993). A model mechanism for the chemotactic response of endothelial cells to tumour angiogenesis factor. *Mathematical Medicine and Biology*, 10(3) :149–168.

Citron, M., Berry, D., Cirrincione, C., Hudis, C., Winer, E., Gradishar, W., Davidson, N., Martino, S., Livingston, R., Ingle, J., et al. (2003). Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer : first report of intergroup trial c9741/cancer and leukemia group b trial 9741. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8) :1431–1439.

Claret, L., Girard, P., Hoff, P., Van Cutsem, E., Zuideveld, K., Jorga, K., Fagerberg, J., and Bruno, R. (2009). Model-based prediction of phase iii overall survival in colorectal cancer on the basis of phase ii tumor dynamics. *Journal of Clinical Oncology*, 27(25) :4103–4108.

Cristini, V., Li, X., Lowengrub, J., and Wise, S. (2009). Nonlinear simulations of solid tumor growth using a mixture model : invasion and branching. *Journal of mathematical biology*, 58(4) :723–763.

Cristini, V., Lowengrub, J., and Nie, Q. (2003). Nonlinear simulation of tumor growth. *Journal of Mathematical Biology*, 46(3) :191–224.

Czabanka, M., Vinci, M., Heppner, F., Ullrich, A., and Vajkoczy, P. (2009). Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *International Journal of Cancer*, 124(6) :1293–1300.

Debnath, J., Mills, K., Collins, N., Reginato, M., Muthuswamy, S., and Brugge, J. (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, 111(1) :29–40.

Dickson, P., Hamner, J., Sims, T., Fraga, C., Ng, C., Rajasekeran, S., Hagedorn, N., McCarville, M., Stewart, C., and Davidoff, A. (2007). Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clinical cancer research*, 13(13) :3942–3950.

Dormann, S., Deutsch, A., et al. (2002). Modeling of self-organized avascular tumor growth with a hybrid cellular automaton. *In silico biology*, 2(3) :393–406.

Drasdo, D. and Höhme, S. (2003). Individual-based approaches to birth and death in avascu1ar tumors. *Mathematical and Computer Modelling*, 37(11) :1163–1175.

Drasdo, D. and Höhme, S. (2005). A single-cell-based model of tumor growth in vitro : monolayers and spheroids. *Physical biology*, 2 :133.

Ferrara, N. (2002). Vegf and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10) :795–803.

Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. 29(6) :15–18.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 57 :1–18.

Friberg, L., Henningsson, A., Maas, H., Nguyen, L., and Karlsson, M. (2002). Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *Journal of clinical oncology*, 20(24) :4713–4721.

Glazier, J. and Graner, F. (1993). Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E*, 47(3) :2128.

Gorelik, B., Ziv, I., Shohat, R., Wick, M., Hankins, W., Sidransky, D., and Agur, Z. (2008). Efficacy of weekly docetaxel and bevacizumab in mesenchymal chondrosarcoma : a new theranostic method combining xenografted biopsies with a mathematical model. *Cancer research*, 68(21) :9033.

Graner, F. and Glazier, J. (1992). Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69(13) :2013–2016.

Grant, M., Mostov, K., Tlsty, T., and Hunt, C. (2006). Simulating properties of in vitro epithelial cell morphogenesis. *PLoS computational biology*, 2(10) :e129.

Greenspan, H. (1972). Models for the growth of a solid tumor by diffusion. *Stu d. Appl. Math*, 51(4) :317–340.

Greenspan, H. (1976). On the growth and stability of cell cultures and solid tumors*. *Journal of theoretical biology*, 56(1) :229–242.

Guibal, A., Taillade, L., Mulé, S., Comperat, E., Badachi, Y., Golmard, J., Le Guillou-Buffello, D., Rixe, O., Bridal, S., and Lucidarme, O. (2010). Noninvasive contrast-enhanced us quantitative assessment of tumor microcirculation in a murine model : Effect of discontinuing anti-vegf therapy1. *Radiology*, 254(2) :420–429.

Gupta, G. and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis : building a framework. *Cell*, 127(4) :679–695.

Hahnfeldt, P., Panigrahy, D., Folkman, J., and Hlatky, L. (1999). Tumor development under angiogenic signaling : a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Research*, 59(19) :4770.

Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3) :353 – 364.

Hanahan, D. and Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1) :57–70.

Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144(5) :646–674.

Hu, M., Yao, J., Carroll, D., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., et al. (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer cell*, 13(5) :394–406.

Hucka, M., Finney, A., Sauro, H., Bolouri, H., Doyle, J., Kitano, H., Arkin, A., Bornstein, B., Bray, D., Cornish-Bowden, A., et al. (2003). The systems biology markup language (sbml) : a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics*, 19(4) :524–531.

Jain, R. (1988). Determinants of tumor blood flow : a review. *Cancer research*, 48(10) :2641–2658.

Jain, R. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 7(9) :987–989.

Jain, R. (2005). Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706) :58.

Jiang, Y., Pjesivac-Grbovic, J., Cantrell, C., and Freyer, J. (2005). A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophysical journal*, 89(6) :3884–3894.

Kim, S., Debnath, J., Mostov, K., Park, S., and Hunt, C. (2009). A computational approach to resolve cell level contributions to early glandular epithelial cancer progression. *BMC systems biology*, 3(1) :122.

Klein, C. (2008). The metastasis cascade. *Science*, 321(5897) :1785–1787.

Laird, A. (1964). Dynamics of tumour growth. *British Journal of Cancer*, 18(3) :490.

Le Novère, N., Hucka, M., Mi, H., Moodie, S., Schreiber, F., Sorokin, A., Demir, E., Wegner, K., Aladjem, M., Wimalaratne, S., et al. (2009). The systems biology graphical notation. *Nature biotechnology*, 27(8) :735–741.

Lombardi, D., Iollo, A., Colin, T., Saut, O., et al. (2012). Inverse problems in tumor growth modeling by means of semiempirical eigenfunctions. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*.

Lowengrub, J., Frieboes, H., Jin, F., Chuang, Y., Li, X., Macklin, P., Wise, S., and Cristini, V. (2010). Nonlinear modelling of cancer : bridging the gap between cells and tumours. *Nonlinearity*, 23 :R1.

Ma, J., Li, S., Reed, K., Guo, P., and Gallo, J. (2003). Pharmacodynamic-mediated effects of the angiogenesis inhibitor su5416 on the tumor disposition of temozolomide in subcutaneous and intracerebral glioma xenograft models. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3) :833–839.

Macklin, P., McDougall, S., Anderson, A., Chaplain, M., Cristini, V., and Lowengrub, J. (2009). Multiscale modelling and nonlinear simulation of vascular tumour growth. *Journal of mathematical biology*, 58(4) :765–798.

Mantzaris, N., Webb, S., and Othmer, H. (2004). Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis. *Journal of Mathematical Biology*, 49(2) :111–187.

Matsuno, H., Chen, L., and Miyano, S. (2006). Petri net based descriptions for systematic understanding of biological pathways. *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, 89(11) :3166–3174.

McElwain, D. and Morris, L. (1978). Apoptosis as a volume loss mechanism in mathematical models of solid tumor growth. *Mathematical Biosciences*, 39(1-2) :147–157.

McElwain, D. and Ponzo, P. (1977). A model for the growth of a solid tumor with non-uniform oxygen consumption. *Mathematical Biosciences*, 35(3-4) :267–279.

Miller, A., Hoogstraten, B., Staquet, M., and Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, 47 :207–214.

Morrow, P., Zambrana, F., and Esteva, F. (2009). Recent advances in systemic therapy : Advances in systemic therapy for her2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 11(4) :207.

Muthuswamy, S., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M., and Brugge, J. (2001). Erbb2, but not erbb1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature cell biology*, 3(9) :785.

Nahta, R. and Esteva, F. (2006). Herceptin : mechanisms of action and resistance. *Cancer letters*, 232(2) :123–138.

Norton, L. (1988). A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer research*, 48(24 Part 1) :7067.

Norton, L. (2001). Theoretical concepts and the emerging role of taxanes in adjuvant therapy. *The Oncologist*, 6(Supplement 3) :30–35.

Norton, L., Simon, R., BRERETON, H., and BOGDEN, A. (1976). Predicting the course of gompertzian growth. *Nature*.

O Brien, L., Zegers, M., and Mostov, K. (2002). Building epithelial architecture : insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7) :531–537.

Oken, M., Creech, R., Tormey, D., Horton, J., Davis, T., McFadden, E., and Carbone, P. (1982). Toxicity and response criteria of the eastern cooperative oncology group. *American journal of clinical oncology*, 5(6) :649.

Owen, M., Alarcón, T., Maini, P., and Byrne, H. (2009). Angiogenesis and vascular remodelling in normal and cancerous tissues. *Journal of mathematical biology*, 58(4) :689–721.

Pawlik, T. and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 59(4) :928–942.

Perfahl, H., Byrne, H., Chen, T., Estrella, V., Alarcón, T., Lapin, A., Gatenby, R., Gillies, R., Lloyd, M., Maini, P., et al. (2011). Multiscale modelling of vascular tumour growth in 3d : the roles of domain size and boundary conditions. *PloS one*, 6(4) :e14790.

Petersen, O., Rønnov-Jessen, L., Howlett, A., and Bissell, M. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19) :9064.

Pickering, L., Rudman, S., Ross, P., and Leslie, M. (2008). Targeted therapy in colorectal carcinoma : more than a theory. *Colorectal Disease*, 10(3) :209–218.

Please, C., Pettet, G., and McElwain, D. (1998). A new approach to modelling the formation of necrotic regions in tumours. *Applied mathematics letters*, 11(3) :89–94.

Please, C., Pettet, G., and McElwain, D. (1999). Avascular tumour dynamics and necrosis. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 9(4) :569–580.

Ramis-Conde, I., Chaplain, M., Anderson, A., and Drasdo, D. (2009). Multiscale modelling of cancer cell intravasation : the role of cadherins in metastasis. *Physical biology*, 6 :016008.

Ramis-Conde, I., Drasdo, D., Anderson, A., and Chaplain, M. (2008). Modeling the influence of the e-cadherin-[beta]-catenin pathway in cancer cell invasion : A multiscale approach. *Biophysical journal*, 95(1) :155–165.

Rejniak, K. and Anderson, A. (2011). State of the art in computational modelling of cancer. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*.

Rejniak, K., Wang, S., Bryce, N., Chang, H., Parvin, B., Jourquin, J., Estrada, L., Gray, J., Arteaga, C., Weaver, A., et al. (2010). Linking changes in epithelial morphogenesis to cancer mutations using computational modeling. *PLoS Computational Biology*, 6(8) :e1000900.

Ribba, B., Colin, T., and Schnell, S. (2006a). A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3(1) :7.

Ribba, B., Kaloshi, G., Peyre, M., Ricard, D., Calvez, V., Tod, M., Bernard, B., Idbaih, A., Psimaras, D., Dainese, L., et al. (2012). A tumor growth inhibition model for low-grade glioma treated with chemotherapy or radiotherapy. *Clinical Cancer Research*.

Ribba, B., Saut, O., Colin, T., Bresch, D., Grenier, E., and Boissel, J. (2006b). A multiscale mathematical model of avascular tumor growth to investigate the therapeutic benefit of anti-invasive agents. *Journal of theoretical biology*, 243(4) :532–541.

Ribba, B., Watkin, E., Tod, M., Girard, P., Grenier, E., You, B., Giraudo, E., and Freyer, G. (2011). A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *European Journal of Cancer*, 47(3) :479–490.

Rocchetti, M., Simeoni, M., Pesenti, E., De Nicolao, G., and Poggesi, I. (2007). Predicting the active doses in humans from animal studies : a novel approach in oncology. *European Journal of Cancer*, 43(12) :1862–1868.

Roose, T., Chapman, S., and Maini, P. (2007). Mathematical models of avascular cancer. *Siam Review*, 49(2) :179–208.

Schlatter, R., Schmich, K., Vizcarra, I., Scheurich, P., Sauter, T., Borner, C., Ederer, M., Merfort, I., and Sawodny, O. (2009). On/off and beyond-a boolean model of apoptosis. *PLoS computational biology*, 5(12) :e1000595.

Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E., and Muller, G. (2002). Computational modeling of the dynamics of the map kinase cascade activated by surface and internalized egf receptors. *Nature biotechnology*, 20(4) :370–375.

Sherratt, J. and Chaplain, M. (2001). A new mathematical model for avascular tumour growth. *Journal of Mathematical Biology*, 43(4) :291–312.

Shymko, R. and Glass, L. (1976). Cellular and geometric control of tissue growth and mitotic instability. *Journal of Theoretical biology*, 63(2) :355–374.

Simeoni, M., Magni, P., Cammia, C., De Nicolao, G., Croci, V., Pesenti, E., Germani, M., Poggesi, I., and Rocchetti, M. (2004). Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Research*, 64(3) :1094.

Simon, R. and Norton, L. (2006). The norton–simon hypothesis : designing more effective and less toxic chemotherapeutic regimens. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(8) :406–407.

Simpson-Herren, L. and Lloyd, H. (1970). Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, 54(3) :143.

Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A., and McGuire, W. (1987). A computational study of the development of epithelial acini : Ii. necessary conditions for structure and lumen stability. *Science*, 9 :177–182.

Soule, H., Maloney, T., Wolman, S., Peterson, W., Brenz, R., McGrath, C., Russo, J., Pauley, R., Jones, R., and Brooks, S. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, mcf-10. *Cancer research*, 50(18) :6075.

Stott, E., Britton, N., Glazier, J., and Zajac, M. (1999). Stochastic simulation of benign avascular tumour growth using the potts model. *Mathematical and Computer Modelling*, 30(5) :183 – 198.

Sullivan, P. and Salmon, S. (1972). Kinetics of tumor growth and regression in igg multiple myeloma. *Journal of Clinical Investigation*, 51(7) :1697.

Sutherland, R., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B., and Mueller-Klieser, W. (1986). Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer research*, 46(10) :5320.

Tang, J., Enderling, H., Becker-Weimann, S., Pham, C., Polyzos, A., Chen, C., and Costes, S. (2011). Phenotypic transition maps of 3d breast acini obtained by imaging-guided agent-based modeling. *Integr. Biol.*, 3(4) :408–421.

Tham, L., Wang, L., Soo, R., Lee, S., Lee, H., Yong, W., Goh, B., and Holford, N. (2008). A pharmacodynamic model for the time course of tumor shrinkage by gemcitabine+ carboplatin in non–small cell lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 14(13) :4213–4218.

Therasse, P., Arbuck, S., Eisenhauer, E., Wanders, J., Kaplan, R., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., Van Oosterom, A., Christian, M., et al. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(3) :205–216.

Turner, S. and Sherratt, J. (2002). Intercellular adhesion and cancer invasion : a discrete simulation using the extended potts model. *Journal of Theoretical Biology*, 216(1) :85–100.

Valenzuela, M. and Julian, T. (2007). Ductal carcinoma in situ : biology, diagnosis, and new therapies. *Clinical Cancer Reviews*, 1(1) :16–21.

Valeriote, F. and van Putten, L. (1975). Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents : a review. *Cancer Research*, 35(10) :2619.

Wang, Y., Sung, C., Dartois, C., Ramchandani, R., Booth, B., Rock, E., and Gobburu, J. (2009). Elucidation of relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer patients can aid early decision making in clinical drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(2) :167–174.

Ward, J. and King, J. (1997). Mathematical modelling of avascular-tumour growth. *Mathematical Medicine and Biology*, 14(1) :39–69.

Ward, J. and King, J. (1999). Mathematical modelling of avascular-tumour growth ii : modelling growth saturation. *Mathematical Medicine and Biology*, 16(2) :171–211.

Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib : a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10) :835–844.

Zhang, L., Pfister, M., and Meibohm, B. (2008). Concepts and challenges in quantitative pharmacology and model-based drug development. *The AAPS journal*, 10(4) :552–559.