



Université de Paris

École doctorale médicament, toxicologie, chimie & imagerie

Unité Inserm UMR 1275

CAP ParisTech : Carcinose Péritonéale Paris-Technologies

Modifications hémodynamiques dans les artères afférentes en amont de réseaux vasculaires néoformés

*Applications précliniques et cliniques sur lésions
tumorales malignes ou bénignes : carcinome
hépatocellulaire, carcinose péritonéale et
malformations artérioveineuses*

Par Matthias BARRAL

Thèse de doctorat d'Imagerie Biomédicale

Dirigée par Philippe BONNIN

Et par Marc POCARD

Présentée et soutenue publiquement le 7 octobre 2019

Devant un jury composé de :

Philippe SOYER, PU-PH, service de Radiologie, Hôpital Cochin, président du jury

Irène BUVAT, Directrice de recherche de l'UMR CEA/Inserm/Université Paris Sud, ERL CNRS
Imagerie Moléculaire In Vivo, rapporteur

François CORNELIS, PU-PH, service de Radiologie, Hôpital Tenon, rapporteur

Valérie VILGRAIN, PU-PH, service de Radiologie, Hôpital Beaujon, examinateur

Christophe AUBE, PU-PH, service de Radiologie, Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers,
examinateur

Philippe BONNIN, MCU-PH, service de Physiologie clinique – explorations fonctionnelles, Hôpital
Lariboisière, directeur de thèse

Marc POCARD, PU-PH, service de chirurgie digestive et oncologique, Hôpital Lariboisière, co-
directeur de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Titre : Modifications hémodynamiques dans les artères afférentes en amont de réseaux vasculaires néoformés.

Résumé :

Il existe un besoin de marqueurs fonctionnels, in vivo et non invasifs, de la dynamique d'expansion, de stabilité ou de régression du développement tumoral. La prolifération tumorale s'accompagne d'une angiogenèse responsable de l'expansion du réseau vasculaire dans l'organe où se développe la tumeur.

L'hypothèse de travail était que l'expansion des réseaux vasculaires, liés aux seules contingences locales tumorales était responsable d'une diminution des résistances périphériques d'aval ayant pour conséquence une augmentation du débit vasculaire d'amont. L'expansion du réseau vasculaire et l'apparition de communications artérioveineuses intra tumorales sont responsables d'une augmentation des vitesses circulatoires dans le vaisseau natif afférent. Cette augmentation a pour conséquence une augmentation des contraintes de cisaillement appliquées à l'interface sang/vaisseau. Afin de ramener à l'état basal le niveau des forces de cisaillement, l'artère est l'objet d'un remodelage avec un décalage temporel de plusieurs semaines/mois. L'augmentation consécutive du diamètre circulant aboutit alors à la normalisation des contraintes de cisaillement ainsi que des vitesses circulatoires.

Ce travail a pour but de mettre en évidence les phénomènes dynamiques de remodelage vasculaire en amont des organes où se développent des tumeurs en mesurant par échographie Doppler les variations des diamètres circulants, des débits, des vitesses circulatoires et des forces de cisaillement. Le phénomène a été étudié sur des modèles murins de carcinome hépatocellulaire, de pseudomyxome péritonéal et de carcinose péritonéale d'origine ovarienne ; ainsi que chez des patients atteints de pseudomyxome péritonéal, de carcinose péritonéale d'origine ovarienne et de malformations artérioveineuses superficielles de la face.

La prolifération tumorale s'est accompagnée d'une augmentation des vitesses circulatoires dans les artères afférentes : tronc cœliaque pour le carcinome hépatocellulaire, artère mésentérique supérieure pour le pseudomyxome péritonéal et carcinose péritonéale d'origine ovarienne, artères cervicales et faciales pour les malformations artérioveineuses superficielles de la face. Sur les modèles murins, lorsque la maladie était stable ou sous traitement efficace, les vitesses se normalisaient voire diminuaient en corrélation avec la réduction de la masse tumorale, de la densité vasculaire et/ou de la prolifération cellulaire.

Chez les patients en progression de leur maladie, atteints, soit de pseudomyxomes péritonéaux en récurrence, soit porteurs de malformations artérioveineuses de la face progressive, le remodelage artériel et l'augmentation de diamètre circulant étaient en retard sur l'augmentation des débits avec des vitesses et des forces de cisaillement restant élevées. En revanche, les patients présentant une stabilité de leur maladie montraient un remodelage artériel abouti, adapté aux nouvelles conditions hémodynamiques imposées par les lésions vasculaires sans expansion.

Il existe donc une dynamique du remodelage vasculaire dans les artères afférentes en amont des organes où se développent les tumeurs en déphasage temporel par rapport à la dynamique tumorale. L'appréciation de ce déphasage par la mesure des diamètres circulants, des vitesses circulatoires, le calcul des débits et des forces de cisaillement sur l'artère afférente pourrait ainsi permettre d'optimiser la stratégie thérapeutique. La mise en place des différents traitements pourrait être adaptée dans le temps à la dynamique tumorale par un suivi hémodynamique sur l'artère afférente à l'organe atteint.

Mots clefs :

Contraintes de cisaillement, diamètre artériel, vitesses sanguines, angiogenèse tumorale, pseudomyxome péritonéal, carcinome péritonéale, malformation artério-veineuse, échographie Doppler

Title: Hemodynamic changes in the afferent arteries upstream of neoformed vascular networks

Abstract:

There is a need for functional, in vivo and non-invasive biomarkers of expansion, stability or regression of tumor development. Tumor proliferation is accompanied by angiogenesis responsible for the expansion of the vascular network in the organ where the tumor develops.

The hypothesis was that the expansion of vascular networks, linked to local tumor contingencies alone, was responsible for a decrease in downstream peripheral resistance leading to an increase in the upstream blood flow volume. The expansion of the vascular network and the appearance of intravenous arteriovenous communications are responsible for an increase in circulatory velocities in the afferent native vessel. This increase results in an increase in shear stresses applied to the blood / vessel interface. In order to reduce the level of shear stress to the basal state, the artery is remodeled with a time lag of several weeks / month. The consequent increase in the circulating diameter then leads to the normalization of shear stresses as well as circulatory velocities.

This work aims to highlight the dynamic phenomena of vascular remodeling upstream of organs where tumors develop by measuring changes in circulating diameters, flow rates, circulatory velocities and shear stress by Doppler ultrasound. The phenomenon has been studied in murine models of hepatocellular carcinoma, peritoneal pseudomyxoma and peritoneal carcinomatosis of ovarian origin; as well as in patients with peritoneal pseudomyxoma, peritoneal carcinomatosis of ovarian origin and superficial arteriovenous malformations of the face.

Tumor proliferation was accompanied by an increase in circulatory velocities in the afferent arteries: celiac trunk for hepatocellular carcinoma, superior mesenteric artery for peritoneal pseudomyxoma and peritoneal carcinomatosis of ovarian origin, cervical and facial arteries for arteriovenous malformations superficial of the face. In murine models, when the disease was stable or under effective treatment, the rates normalized or even decreased in correlation with the reduction of tumor burden, vascular density and / or cell proliferation. In patients with progressive disease, with recurrent peritoneal pseudomyxoma and progressive arteriovenous malformations of the face, arterial remodeling and circulating diameter increase was late compared to the increase in flow rates and shear forces remaining high. In contrast, patients with stable disease showed achieved arterial remodeling, adapted to the new hemodynamic conditions imposed by vascular lesions without expansion.

There is therefore a dynamic of vascular remodeling in the afferent arteries upstream of the organs where the tumors develop in temporal phase shift with respect to tumor dynamics. The evaluation of this phase shift by the measurement of circulating diameters, circulatory velocities, the calculation of flow rates and shear forces on the afferent artery could thus make it possible to optimize the therapeutic strategy. The implementation of the different treatments could be adapted in time to the tumor dynamics by a hemodynamic follow-up on the artery afferent to the affected organ.

Keywords :

Wall shear stress, arterial diameter, blood flow velocity, tumor angiogenesis, pseudomyxoma peritonei, peritoneal carcinomatosis, arteriovenous malformation, Doppler ultrasound.

REMERCIEMENTS

Au **Docteur Philippe BONNIN**, directeur de thèse.

Je ne saurais par où commencer pour te remercier. Merci d'avoir inspiré et dirigé ce travail. Merci de m'avoir poussé et soutenu jusqu'au bout dans la thèse et tout le reste. Des directeurs de thèse comme toi il n'y en aura pas beaucoup. Merci de ta bienveillance, ton humour, ta finesse et ton analyse, sans toi il n'y aurait pas eu ce travail. J'espère que nous développerons nos concepts d'hémodynamique en oncologie ensemble et que cela profitera à nos patients.

Au **Professeur Marc POCARD**, co-directeur de thèse.

Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de faire de la recherche préclinique et clinique dans une unité dynamique et sympathique. Votre disponibilité, enthousiasme, simplicité, gentillesse, vision de la médecine, et ce que vous accomplissez autour de la carcinose péritonéale sont un exemple. Je souhaite que nous continuions à travailler ensemble.

Au **Professeur Philippe SOYER**, président du jury.

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci d'avoir cru en moi depuis notre première rencontre dans ton service à Lariboisière jusqu'à Cochin. Merci de m'avoir poussé et soutenu dans cette entreprise. Merci de ton enthousiasme pour la recherche clinique et de ton optimisme en général. J'espère que tu auras réussi à me transmettre un peu de ton savoir-faire.

A **Mme Irène BUVAT**, rapporteur.

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur et de me faire l'honneur de juger ce travail. J'espère que nos futures collaborations seront fructueuses.

Au **Professeur François CORNELIS**, rapporteur.

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur et de me faire l'honneur de juger ce travail. J'espère que nos futures collaborations seront fructueuses.

Au **Professeur Valérie VILGRAIN**, examinateur.

Chère Madame, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de me faire le grand honneur de juger ce travail. Je suis très impressionné par vos compétences tant comme radiologue, chercheuse, que chef de service. Vous êtes un exemple pour l'ensemble des radiologues.

Au **Professeur Christophe AUBE**, examinateur.

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre aide.

A toute l'équipe de radiologie de l'Hôpital Lariboisière, de l'Hôpital Cochin, et de l'unité Inserm 1275. Merci d'avoir été présent pour m'aider et me remplacer quand je ne pouvais pas être là.

A Cynthia Pimpie. Merci de ton aide. Sans toi le projet carcinose ovarienne n'aurait pas existé. Merci de ta disponibilité et de m'avoir fait profiter de tes compétences.

Au Dr Rachid Kaci. Merci de ta gentillesse, de tes explications et de ta disponibilité pour analyser les lames de souris.

A mes amis et leurs conjointes : Momo, Ju, Coco, Basile, Louis & Jeff. Merci de votre soutien et de vos conseils.

A Sophie. Merci d'être à mes côtés tous les jours depuis si longtemps et encore pour très longtemps. Merci de nous avoir donné deux merveilleuses filles : Capucine et Clémence, qui exaltent nos jours.

A mes parents : Elena et Jean-François, mes grands-parents : Claude et Marie-Jeanne & Carlos Abdon et Blanca.

A Sébastien.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIÈRES	9
ABRÉVIATIONS	12
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	14
2. PARTIE 1 : ETAT DE L'ART	18
2.1 Historique	19
2.1.1 Eléments d'histoire de la circulation sanguine.....	19
2.1.2 Eléments d'histoire de la circulation tumorale.....	22
2.2 Définitions.....	25
2.2.1 Vasculogenèse	25
2.2.2 Artériogenèse	25
2.2.3 Angiogenèse	26
2.2.3.1 Angiogenèse tumorale.....	26
2.2.3.2 Switch angiogénique	26
2.2.3.3 Angiogenèse par bourgeonnement	32
2.2.3.4 Angiogenèse par intussusception.	33
2.2.3.5 Vaisseaux tumoraux.	34
2.3 Imagerie de la réponse tumorale	38
2.3.1 Rationnel de l'évaluation et du suivi de la réponse tumorale.....	38
2.3.2 Critères morphologiques : RECIST	39
2.3.3 Critères « fonctionnels » / m-RECIST, Choi, Chun.....	41
2.3.4 Cas particulier des lésions hépatiques	42
2.3.5 Cas particulier des malformations artérioveineuses superficielles (MAVS) de la face	44
2.3.6 Cas particulier de la carcinose péritonéale	47
2.4 Hémodynamique	50

2.4.1 Pression hémodynamique, tension pariétale	50
2.4.1.1 Au niveau de l'organisme	50
2.4.1.1.1 La boucle circulatoire	50
2.4.1.1.2 Circulation systémique	50
2.4.1.2 Au niveau de l'organe	53
2.4.1.3 Circulation hépatosplanchnique (cas particulier)	55
2.4.2 Vitesse et débit	56
2.4.3 Tension pariétale	58
2.4.4 Force de cisaillement et remodelage artériel	60
2.5 Structure compartimentale du vaisseau	61
2.5.1 Endothélium	61
2.5.2 Média.....	63
2.5.2.1 Cellules musculaires lisses	63
2.5.2.2 Matrice extracellulaire.....	264
2.5.3 Adventice	65
2.6 Propriété des vaisseaux	66
2.6.1 Régulation locale du débit vasculaire d'un organe	66
2.6.1.1 Vasoconstriction.....	26
2.6.1.2 Vasodilatation.....	26
2.6.2 Interaction vasomotricité et vasotrophie	70
2.7 Remodelage vasculaire, interactions contraintes hémodynamiques / paroi artérielle.....	71
2.8 Moyens d'études	77
2.8.1 Echographie Doppler.....	78
2.8.2 IRM vélocimétrie par contraste de phase	82
2.9 Hypothèse de travail.....	87
3. PARTIE 2 : CONTRIBUTIONS ORIGINALES.....	94

Applications dans le Diagnostic et Suivi de 4 pathologies tumorales.....	95
3.1 Carcinome hépatocellulaire chez la souris	95
3.2 Pseudomyxome péritonéal chez l'homme.....	108
3.3 Malformations artérioveineuses cranio-cervico-faciales superficielles (MAVS) chez l'homme	125
3.4 Carcinose péritonéale d'origine ovarienne chez la souris et chez la femme.....	139
4. PARTIE 3 : DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION	165
ANNEXES	171
Annexe 1	171
Annexe 2 :	172
Annexe 3 :	173
RÉFÉRENCES.....	174

ABRÉVIATIONS

AT-1	Angiotensine II de type 1
AMPC	Adénylate monophosphate cyclique
AMS	Artère mésentérique supérieure
ARN	Acide ribonucléique
bFGF	basic fibroblast growth factor
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHIP	Chimiothérapie hyperthermie intra péritonéale
EASL	European association for the study of liver disease
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
FC	Fréquence cardiaque
GIST	Tumeurs gastro-intestinales stromales
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
ICP	Index de carcinose péritonéal
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MAVS	Malformations artérioveineuses superficielles
m-RECIST	modified-RECIST
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxyde synthase
PA	Pression artérielle
PDGF	Platelet derived growth factor
PIGF	Placental growth factor
PMP	Pseudomyxome péritonéal
Qc	Débit cardiaque

RECIST	Response evaluation criteria in Solid tumor
RST	Résistance systémique totale
TDM	Tomodensitométrie
TGF β 1	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VES	Volume d'éjection systolique
WSS	Wall Shear Stress

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis l'Antiquité, les grands esprits curieux ont tenté de mettre en évidence un rationnel législatif au monde vivant, d'énoncer les lois « biologiques » qui le régissent. Très tôt, la circulation a été suspectée chez les organismes vivants et est apparue comme nécessaire à leur survie, chez l'homme en particulier. La notion d'apports en éléments nutritifs aux organes par voie circulatoire était acquise. Des érudits comme Hippocrate, Aristote et Galien ont proposé des théories de la circulation sanguine correspondant aux connaissances du moment. Mais même si des progrès étaient effectués, des erreurs subsistaient. Il a fallu attendre la Renaissance, l'autorisation de pratiquer de nouveau l'autopsie et les travaux de William Harvey, pour décrire la circulation sanguine et sa boucle à des fins d'apport en nutriments aux tissus et organes comme communément admise aujourd'hui.

A la fin du 18^{ème} siècle, les chercheurs se sont intéressés à la microcirculation et en particulier à la néovascularisation tumorale. La fin du 20^{ème} siècle a vu naître les connaissances permettant de comprendre ses particularités et de mettre au point les premiers traitements anti-angiogéniques. Les examens biologiques et d'imagerie diagnostique suivaient une progression parallèle voire exponentielle. Plus précisément, les examens visant à caractériser la fonction de perfusion tumorale ont pris un essor important qu'il s'agisse des examens utilisant les rayons X, les champs magnétiques, ou les ultrasons pour les techniques les plus employées. Tous possèdent leurs avantages, les ultrasons en particulier, qui, grâce à une résolution temporelle importante, permettent l'analyse des flux circulants, notamment ceux destinés aux tumeurs. L'arsenal diagnostique et thérapeutique s'est agrandi et diversifié. Il a désormais pris une place importante à chaque étape de la prise en charge des cancers. Un besoin de critères fonctionnels d'évaluation et de suivi de l'activité angiogénique tumorale apparaît pour différents modèles de néoangiogenèse tumorale et non tumorale afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique en fonction de

la réponse tumorale. Ces critères fonctionnels d'évaluation et de suivi doivent aller au-delà des critères morphologiques et qualitatifs de rehaussement en imagerie en coupe afin de renseigner sur la dynamique d'évolutivité d'une lésion néoplasique : prolifération, stabilité ou involution.

Notre hypothèse était que l'expansion des réseaux vasculaires, liés aux seules contingences locales tumorales était responsable d'une diminution des résistances périphériques d'aval ayant pour conséquence une augmentation du débit vasculaire d'amont. L'expansion du réseau vasculaire et l'apparition de communications artérioveineuses intra tumorales sont responsables d'une augmentation des vitesses circulatoires dans le vaisseau natif afférent. Cette augmentation a pour conséquence une augmentation des contraintes de cisaillement appliquées à l'interface sang/vaisseau. Afin, de ramener à l'état basal le niveau des forces de cisaillement, l'artère est l'objet d'un remodelage avec un décalage temporel de plusieurs semaines/mois. L'augmentation consécutive du diamètre circulant aboutit alors à la normalisation des contraintes de cisaillement ainsi que des vitesses circulatoires. Dans la phase de décalage/déphasage chronologique entre l'expansion propre du réseau vasculaire tumoral et l'adaptation de l'artère afférente, son remodelage abouti, il existerait donc un moment où les forces de cisaillement et les vitesses circulatoires seraient élevées, permettant le diagnostic d'évolutivité tumorale. Dans le cas d'une normalisation des vitesses et des forces de cisaillement, il serait alors possible de préjuger de la stabilité des lésions tumorales quel que soit le débit imposé par le lit vasculaire tumoral sur l'artère afférente.

Notre objet est ici de présenter l'usage de la technique ultrasonore permettant le suivi des phénomènes dynamiques de remodelage vasculaire en amont des organes où se développent des tumeurs en mesurant les variations des diamètres circulants, des débits, des vitesses circulatoires et des forces de cisaillement par échographie Doppler.

Ces variations pourraient permettre d'avoir accès à un « outil clinique » d'évaluation de la dynamique tumorale : prolifération, stabilité ou involution, c'est à dire un outil préjugeant son évolution spontanée ou sous traitement.

2. PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

2.1 Historique

2.1.1 Eléments d'histoire de la circulation sanguine

Nous savons depuis Aristote et son traité « Parties des Animaux » (330 avant J.C.) que les vaisseaux partent du cœur et distribuent le sang dans tous les organes du corps [1]. Galien (130-200) fut à l'origine d'une description précise des artères et des veines enseignée de façon scolastique, sans modifications, pendant tout le Moyen-âge et jusqu'à la Renaissance. Selon lui, les artères provenaient du cœur, et les veines du foie [2, 3], les artères distribuant la chaleur et les veines les nutriments. Ainsi, il pensait que le sang provenait des nutriments digérés par le système digestif puis formait une « coction » dans le foie et qui inondait ensuite les veines qui apportaient alors la nourriture aux différents organes [1]. Une partie de ce sang veineux remontait par la veine cave supérieure vers le cœur droit où il se scindait alors en deux :

1. Une partie passant par l'oreillette puis le ventricule droit qui l'éjectait alors vers les poumons par la « veine artérielle » (artère pulmonaire) afin qu'il se charge de « pneuma » ;
2. l'autre passait par des micropores au travers du septum inter ventriculaire vers le cœur gauche où il se réchauffait et se chargeait du « pneuma » en se mélangeant au sang veineux issu de « l'artère veineuse » (veine pulmonaire) afin de former une nouvelle « coction ».

Galien pensait qu'il y avait une circulation à double sens dans cette artère veineuse permettant d'éliminer les déchets provenant de la coction cardiaque [2]. Enfin les artères issues du cœur allaient ensuite apporter la chaleur innée issue du cœur mélangé au pneuma à la circulation périphérique. Galien avait bien subodoré la notion de double circulation mais il persistait dans son raisonnement une erreur fondamentale que constituait la porosité inter ventriculaire. Celle-ci fut tout d'abord remise en question par Ibn-Al-Nafis (1211-1288 ou

1296) en Syrie et dans tout l'empire arabe [4]. En Europe, il fallut attendre que Miguel Servet (1503-1553) remette en question la théorie de Galien et mette en évidence le concept de « petite circulation » comme nous la connaissons aujourd'hui [4]. En effet, il conclut après de nombreuses dissections que le sang ne pouvait pas traverser le septum inter ventriculaire, et qu'il devait se frayer un chemin à partir du cœur droit par la veine artérielle qui contenait alors l'ensemble du sang veineux puis au travers du poumon avant de retourner par l'artère veineuse chargée de sang vers le cœur gauche et enfin la circulation générale par l'aorte. Michel Servet et ses successeurs jetèrent les bases du concept de circulation sanguine dont le moteur serait le cœur et non plus le foie. Realdo Colombo (1516-1559) acheva la mise à jour des théories de Galien en décrivant l'existence des valves sur toutes les cavités cardiaques n'autorisant une circulation que dans un seul sens [4]. En outre, il décrit la systole et la diastole comme des phases de contraction et de repos des ventricules définissant ainsi un cycle cardiaque. Enfin il remet en question la théorie du pneuma affirmant que la veine pulmonaire amène au cœur un sang dans lequel il n'y a « pas un soupçon d'air ». Le concept de circulation sanguine continue s'esquissa grâce à Andrea Cesalpino (1519-1603) qui montra que lorsqu'on comprime une veine, elle se distend « sous » de la zone de compression. Puis, Fabricius d'Acquapendente (1578-1657) maître de William Harvey décrira lui l'existence de valvules sur les veines sans en comprendre l'utilité [1, 4]. Ces chercheurs ont préparé le terrain à la description par William Harvey de la circulation sanguine comme nous la connaissons aujourd'hui et permirent l'effondrement des théories fausses de Galien.

Cette vision révolutionnaire de « circulation sanguine » s'imposa donc avec William Harvey (1578-1657) qui écrivit en 1616 : « *Il résulte de la structure du cœur que le sang est envoyé continuellement à travers les poumons vers l'aorte comme par les deux clapets d'une pompe à élever l'eau. Il est établi par l'application d'une ligature que l'écoulement du sang se fait des artères aux veines. D'où il suit que le mouvement du sang est constamment circulaire et qu'il est entretenu par les battements du cœur* ». Il montra notamment que le volume de sang qui traverse l'aorte est largement supérieur aux besoins nutritifs et dépasse, en une demi-heure, la quantité totale de sang contenue dans l'organisme. Il en conclut que tout le sang circule de manière continue dans le corps, poussé par la contraction du ventricule gauche dans les artères [1, 4]. Il passe des artères aux veines en traversant les tissus de l'ensemble du corps, et les veines le ramènent vers le ventricule droit. Il est évident, pour Harvey, que si la circulation n'était pas continue, les veines s'assécheraient rapidement et que les artères seraient distendues, voire déchirées par la pression.

Il manquait cependant à William Harvey le lien entre les artères et les veines afin de compléter le « cercle » de la circulation sanguine. Il faudra alors attendre l'arrivée du premier microscope et les observations de Marcello Malpighi (1628 – 1694) sur les capillaires sanguins à la surface des poumons et de la vessie [5]. Il compléta alors les théories de Harvey en observant le mouvement du sang au travers des capillaires sanguins. Le sang circule donc, arrive jusqu'aux tissus par les artères et via un réseau de capillaires qui relie les artères et les veines, puis en repart en repassant dans la circulation veineuse. Le concept de circulation systémique et pulmonaire était enfin établi. La circulation systémique apporte l'oxygène et les nutriments pour assurer la bonne trophicité et la bonne fonction des différents organes. La circulation pulmonaire quant à elle assure l'hématose du sang. Les notions d'apport sanguin artériel aux tissus tumoraux vont ensuite être soupçonnées comme étant une des clés de la croissance tumorale.

2.1.2 Eléments d'histoire de la circulation tumorale

On sait aujourd'hui que la croissance des tumeurs solides et l'envahissement des tissus sains sont intimement liés à l'angiogenèse tumorale. En effet, la croissance des tumeurs est sous la dépendance de facteurs intra tumoraux et d'interactions avec le tissu environnant. Dans la phase dite de latence des tumeurs très peu de vaisseaux sont décelés. Au contraire lors de la phase invasive, l'angiogenèse est massive pour subvenir aux besoins métaboliques des tissus tumoraux néoformés.

Le concept d'une microcirculation sanguine alimentant les tumeurs démarre avec les travaux de Golgi et Virchow qui évoquent au XIXème siècle une participation du stroma vasculaire tumoral au développement des cancers. C'est ainsi que naît le concept d'une vascularisation tumorale propre, reflet de son autonomie de développement.

« Angiogenèse » est un terme attribué à tort au chirurgien écossais le Dr John Hunter (1728 - 1793), qui décrivit la croissance des vaisseaux sanguins néoformés dans les bois de rennes à la suite d'une exposition prolongée au froid [6]. Il observe aussi une recrudescence de nouveaux vaisseaux dans les oreilles de lapin lors d'une inflammation. Il fut par conséquent un des premiers à décrire le phénomène de formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseau préexistant. Mais le terme même d'angiogenèse n'apparaîtra qu'un siècle plus tard au début du 20ème siècle avec l'apparition de nombreux travaux en embryologie [6].

Puis, le Dr Arthur Tremain Hertig (1904 - 1990), un pathologiste de Boston, fera la première description histologique en 1935 de l'angiogenèse dans le placenta des guenons en cours de gestation. En 1939, sur la base d'observations de tumeurs transplantées dans des chambres transparentes sur des modèles animaux in vivo, A. G. Ide et al. proposent l'existence d'un facteur dérivé de la tumeur capable de stimuler la formation de vaisseaux sanguins [7]. En 1945, G. H. Algire et ses collègues mettent en évidence que la vascularisation tumorale provient de l'hôte et est essentielle à la croissance tumorale [8]. Les découvertes d'Algire et al.

offraient la première preuve de l'association entre le système vasculaire de la tumeur et la croissance tumorale. En 1948, I. C. Michaelson postule qu'un facteur angiogénique diffusible produit par la rétine confère le phénotype de néo vascularisation observé lors de la rétinopathie diabétique proliférante et baptisait ce facteur soluble «facteur X» [9]. Vingt ans plus tard, Greenblatt et Shubik, et Ehrmann et Knoth démontrent de manière indépendante que les cellules tumorales peuvent stimuler la vasoprolifération par des expériences de diffusion au travers d'un filtre et confirment ainsi la notion de facteur angiogénique diffusible élaboré par les cellules tumorales.

En 1971 le Dr Judah Folkman (1934 - 2008), chirurgien de l'université d'Harvard, soupçonna que la croissance tumorale dépendait de la néo vascularisation. Folkman et al. ont implanté avec succès des fragments tumoraux dans des territoires avasculaires comme la cornée en faisant l'hypothèse que la tumeur assurerait sa propre vascularisation en relarguant des médiateurs cellulaires qui permettraient aux cellules endothéliales quiescentes du tissu hôte environnant de s'activer, de rompre la matrice extracellulaire et de répondre aux stimuli du nouveau microenvironnement. Ils ont ensuite émis deux hypothèses. La première est qu'en bloquant l'action de ces médiateurs, on priverait les tumeurs de sang, ce qui les tuerait. La seconde est que ce blocage ralentirait la dissémination du cancer (métastases) car les cellules cancéreuses utilisent la voie circulatoire systémique comme la voie lymphatique pour disséminer dans l'organisme. Il a ainsi montré au cours d'expériences sur organes isolés que la privation de vascularisation diminuait significativement la croissance tumorale. Le concept d'un traitement antiangiogénique était né.

Quatre années plus tard, en 1975 : le Dr Henry Brem et le Dr Judah Folkman montrent que le cartilage bovin contient une substance capable d'empêcher la formation de vaisseaux sanguins. Plus précisément, le cartilage est un tissu dépourvu de vaisseaux car il contient un ou plusieurs facteurs anti-angiogéniques capables d'entraver la prolifération des cellules

endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux. Tim Berners-Lee et Robert Langer font le même constat en 1983 pour le cartilage de requin [10]. A noter que chez les requins, le cartilage représente 6 à 8 % de leur masse corporelle alors qu'il ne représente que moins d'un pour-cent chez les bovins. Les requins constitueraient dès lors une source importante de substances anti-angiogéniques. Rapidement, le premier facteur angiogénique, le bFGF (basic fibroblast growth factor) est purifié en 1985 par Yuen W. Shing et Michael Klagsbrun à la Harvard Medical School. En 1989, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'un des plus importants facteurs angiogéniques, est découvert par le Dr Napoleone Ferrara, biologiste italien de la firme pharmaceutique Genentech. Le premier traitement réussi par un interféron alpha2a d'une tumeur bénigne dépendante de la néovascularisation, un hémangiome pulmonaire, est rapporté par le Dr Carl White, un radiologue pédiatrique à Denver en 1989. Enfin en 1992, le premier essai clinique d'une drogue antiangiogéniques (TNP-470) commence chez les patients atteints de cancer. Depuis ces découvertes initiales, plus de 30 inhibiteurs naturels de l'angiogenèse et plus de 20 facteurs de croissance angiogéniques ont été caractérisés.

2.2 Définitions

2.2.1 Vasculogenèse

Le terme de vasculogenèse désigne la formation de vaisseaux sanguins « de novo ». Ce processus étant essentiellement observé lors du développement embryonnaire. En effet, les vaisseaux sanguins apparaissent très tôt au début du développement embryonnaire afin d'apporter oxygène et nutriments aux organes en formation, et ce à partir d'un certain volume. Ainsi, les cellules centrales de l'organe qui ne sont alors plus soumises à une pO_2 suffisante pour assurer leur bonne trophicité et leur croissance sont alors alimentées par capillarité avec la périphérie de l'organe.

Le processus de vasculogenèse commence par une différenciation *in situ* d'hémangioblastes ou cellules endothéliales progénitrices embryonnaires à partir de tissus non vasculaires. Les cellules endothéliales migrent alors et prolifèrent pour former l'arbre vasculaire primitif. Il va proliférer avec l'apparition de vaisseaux de différent calibre qui vont assurer les besoins métaboliques des différents organes en croissance.

Cependant, outre ces phénomènes embryologiques, il a été plus récemment démontré l'existence de ces cellules endothéliales progénitrices circulantes capables de proliférer, de se différencier et de participer à la formation en néovaisseaux sanguins au cours de processus pathologiques chez l'adulte comme l'angiogenèse tumorale, la néo vascularisation lors de l'ischémie critique des membres inférieurs ou après infarctus du myocarde [11, 12].

2.2.2 Artériogenèse

L'artériogenèse est un processus qui permet la formation *in situ* d'artères collatérales de type musculaire lors des phénomènes d'ischémie chronique tissulaire liés à l'obstruction d'une artère native vascularisant normalement un organe [13, 14]. Ainsi, des études chez l'animal ont démontré que l'occlusion de l'artère fémorale initiait dans les minutes qui suivent

un processus d'activation des cellules endothéliales artérielles, induit par une augmentation des forces de cisaillement dans les artères collatérales. Puis dans un second temps (1 à 3 jours), les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes quiescents entrent en division mitotique. Il en résulte un élargissement du diamètre de ces artères collatérales. Enfin dans un 3ème temps dit phase de synthèse, la digestion de la lamina élastique interne permet la libération et la migration des cellules musculaires lisses et des fibroblastes depuis la média vers l'espace sous-endothélial, créant ainsi une couche néo-intimale épaisse. Cette croissance collatérale s'achève avec un ralentissement de la prolifération, de la migration et de l'activité protéolytique, d'une restauration de l'activité contractile des cellules musculaires lisses et de la néoformation d'une lamina élastique interne sous endothéliale. Ainsi les artères collatérales peuvent augmenter leur calibre d'un facteur 3 afin de multiplier leur capacité de débit d'un facteur 10 permettant une compensation à hauteur de 30% du débit maximal normal [14].

2.2.3 Angiogenèse

On distingue la vasculogenèse qui est la formation de néo vaisseaux de novo, de l'angiogenèse qui est la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux sanguins déjà existants ou plus précisément à partir de cellules endothéliales matures. En effet, le développement de l'embryon et notamment de ses organes va s'accompagner du développement de nouveaux vaisseaux sanguins de petit calibre à partir de l'arbre vasculaire primitif par bourgeonnement : il s'agit d'une angiogenèse. L'angiogenèse est un mécanisme adaptatif qui perdurera au cours du développement adulte et qui permettra des mécanismes divers tels que la cicatrisation, l'ovulation ou les menstruations. L'angiogenèse est donc un processus physiologique normal qui permet la régénération et le développement de tissus sains. Cependant lors de mécanismes pathologiques tels que

l'inflammation, l'ischémie ou la cancérogenèse, il existe des déséquilibres dans les mécanismes de régulation de l'angiogenèse.

2.2.3.1 Angiogenèse tumorale

Le développement des cancers (carcinogénèse) est un processus qui se décompose en plusieurs étapes. On pense aujourd'hui qu'il existe pour chaque tumeur un volume de quelques millilitres en deçà duquel la tumeur est incapable d'induire sa propre vascularisation [15]. Jusqu'à une taille d'environ 2 mm de diamètre, la carcinogénèse est dite en phase « dormante », il existe alors un équilibre entre prolifération et apoptose. Il faudra donc une certaine masse critique au-delà de laquelle des cellules tumorales situées au centre du volume auront un apport en oxygène et en nutriment insuffisant du fait de leur distance par rapport aux vaisseaux sanguins natifs (environ 150 μm) pour que ces cellules sécrètent des facteurs stimulant l'angiogenèse tels que le VEGF ou le hypoxia inducible factor -1 [16–18]. Ainsi, seule une faible proportion de tumeurs en phase dormante entrera en phase proliférative grâce au développement de sa propre vascularisation, ce processus est dénommé « switch angiogénique ». Ce phénomène entraîne la production de facteurs pro-angiogéniques ou la perte d'inhibition de facteurs anti-angiogéniques et permet l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins adjacents à la tumeur. Les cellules endothéliales natives acquièrent la possibilité de dégrader la membrane basale, migrent, s'allongent, prolifèrent et s'organisent en structure tubulaire, créant ainsi un nouveau réseau vasculaire entre les vaisseaux natifs de l'hôte et la tumeur.

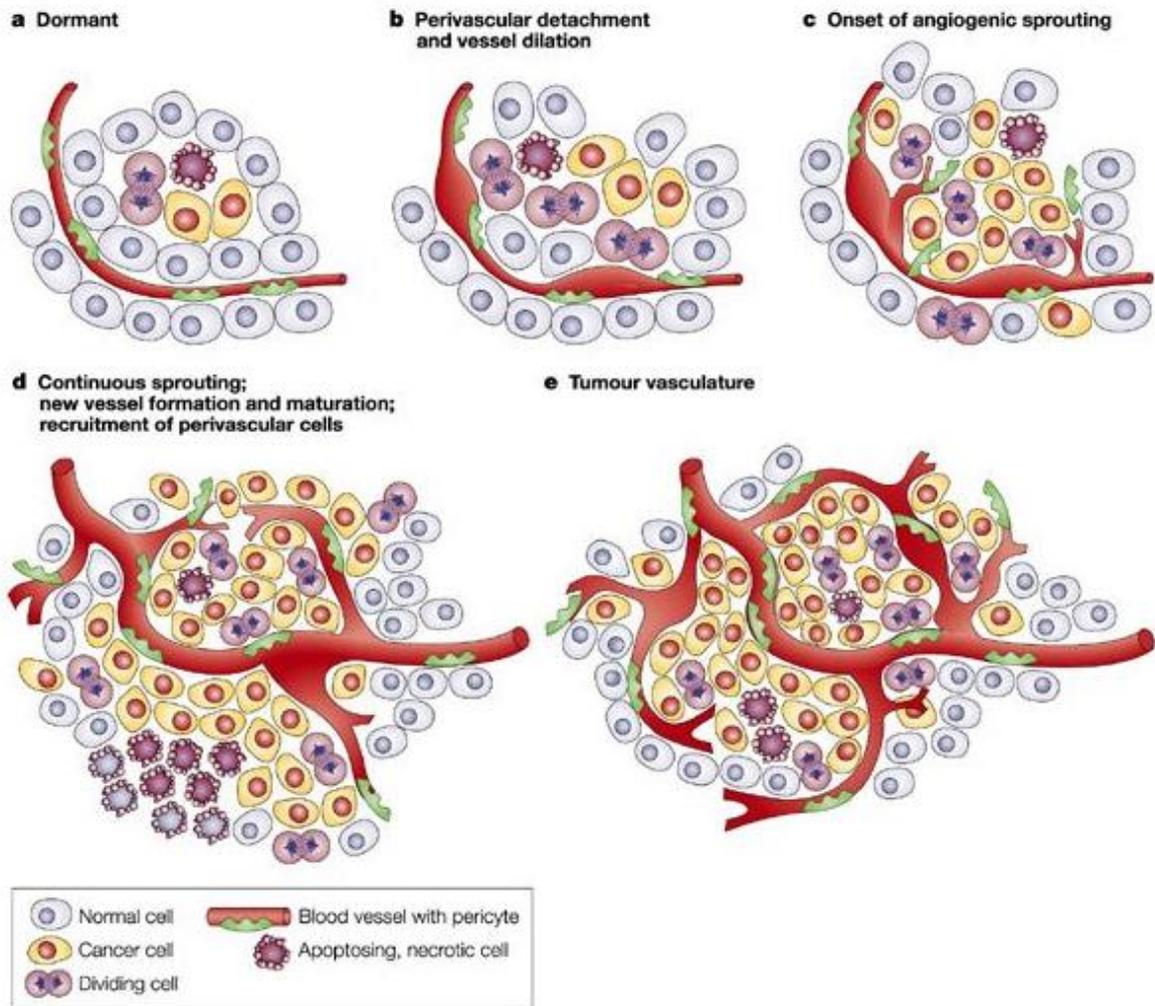
2.2.3.2 Switch angiogénique

Afin de s'autonomiser et de proliférer, la tumeur va sécréter un excès de molécules

angiogéniques et activer les cellules endothéliales quiescentes de l'hôte [19]. Le concept de switch angiogénique tumoral correspond au processus au cours duquel une tumeur passe d'un état latent à un état invasif. Il s'agit d'un événement clef de la cancérogenèse qui correspond à une rupture de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques du milieu, en faveur des facteurs pro-angiogéniques. En effet, en atteignant une masse critique > 2 ml, la probabilité de trouver une cellule tumorale mutante responsable de l'activation angiogénique est presque certaine. Cette mutation survient alors soit par une activation oncogénique, soit par l'inhibition d'un gène suppresseur de tumeur. Le switch angiogénique est donc un déséquilibre dans la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur des facteurs pro-angiogéniques.

Le passage de la phase « dormante » à la phase active est le résultat de 5 étapes (**Figure 1**) [20]:

Figure 1. Le switch angiogénique en 5 étapes [20]



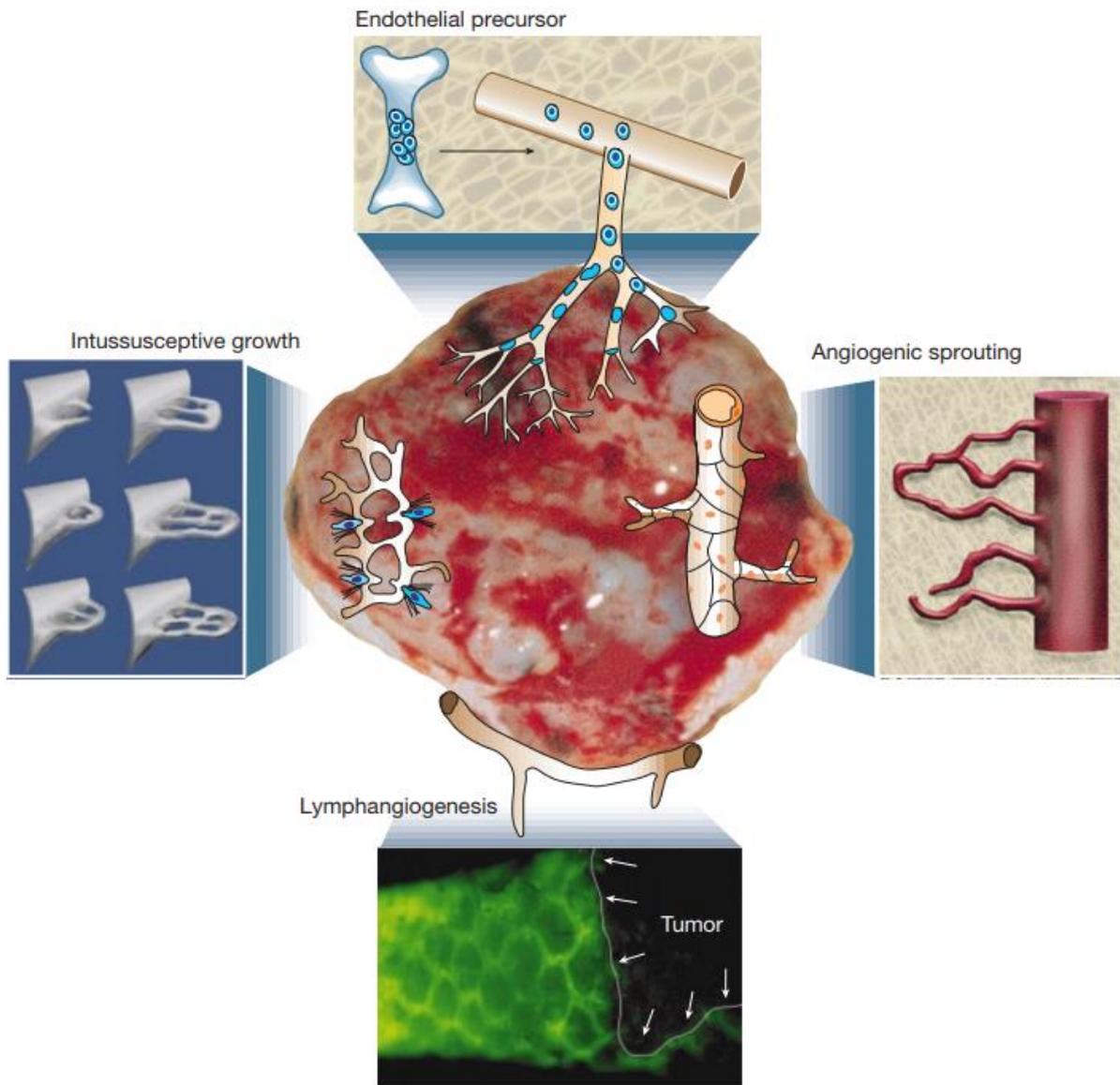
1) Phase dormante avasculaire 2) détachement des péricytes et dilatation des vaisseaux 3) début du bourgeonnement angiogénique 4) formation et maturation de nouveaux vaisseaux 5) vascularisation tumorale = phase vasculaire active.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant l'initiation des processus d'angiogenèse tumorale sont mixtes et font intervenir en différentes proportions l'hypoxie, le stress cellulaire et l'activation oncogénique c'est à dire la mise en jeu de boucles autocrines de facteurs de croissance. Le VEGF, le PlGF (Placental growth factor), le bFGF et l'angiopoïétine 1 sont ces

facteurs angiogéniques qui sont alors devenus des cibles thérapeutiques importantes. En effet, le blocage du switch angiogénique permettrait de maintenir les îlots de cellules tumorales en phase « dormante » afin d'empêcher leur prolifération à un stade très précoce et leur dissémination.

Une fois enclenché, il existe deux modes majeurs d'angiogenèse : l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception (**Figure 2**).

Figure 2. Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse tumorale
[15].

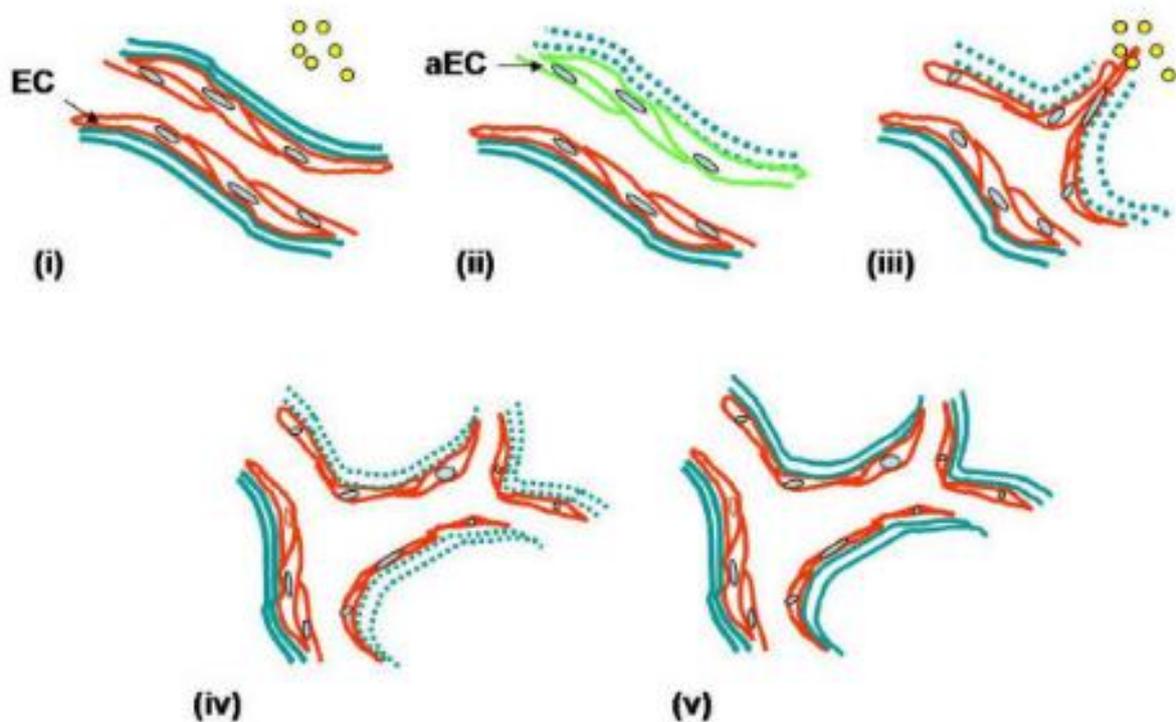


(1) Le réseau vasculaire hôte se dilate en formant des bourgeons endothéliaux ou en formant des ponts (angiogenèse par bourgeonnement); (2) les vaisseaux tumoraux se remodelent et se dilatent en insérant des colonnes de tissus interstitiels dans la lumière de vaisseaux préexistants (angiogenèse par intussusception); et (3) des précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique et aboutissent dans les tumeurs et contribuent à la paroi endothéliale des vaisseaux tumoraux (vasculogenèse). Les vaisseaux lymphatiques autour des tumeurs drainent le liquide interstitiel et constituent une passerelle pour les métastases des cellules tumorales (lymphangiogenèse).

2.2.3.3 Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement ou « *sprouting* » est décrite initialement par Von Kölliker (**Figure 3**). Le « *sprouting* » est déclenché par le VEGF-A, et s'accompagne d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité endothéliale favorisant l'extravasation de protéines plasmatiques et la formation d'une matrice extracellulaire adaptée à la migration des cellules endothéliales puis à la formation de tubes, événement plus tardif du processus. La formation de cette matrice entraîne la perte des liaisons inter-endothéliales et de l'adhésion entre les cellules endothéliales et les péricytes (cellules musculaires lisses responsable de la contraction et de la régulation locale du débit sanguin), ceci sous le contrôle du système angiopoiétine-1/ angiopoiétine-2/ récepteur Tie 2 [21]. Ainsi les cellules endothéliales proliférantes migrent vers le site de néo vascularisation et s'organisent en structures tubulaires. La prolifération de cellules endothéliales en transit est alors induite par le VEGF-A et la dégradation de la matrice extracellulaire est accélérée grâce à la synthèse de métalloprotéases et d'activateurs du plasminogène.

Figure 3. Angiogenèse par bourgeonnement [22]



(i) Réception de signaux angiogéniques (tache jaune) provenant de l'environnement par les cellules endothéliales (EC); (ii) rétraction des péricytes de la surface abluminale des capillaires et sécrétion de protéase à partir de cellules endothéliales activées (aEC) et dégradation protéolytique de la membrane extracellulaire (ligne pointillée verte); (iii) migration chimiotactique de la cellule endothéliale sous l'induction de stimulateurs angiogéniques; (iv) prolifération de cellules endothéliales et formation de lumière par fusion de vaisseaux formés avec formation de jonctions serrées; (v) recrutement de péricytes et dépôt d'une nouvelle membrane basale et début du flux sanguin.

2.2.3.4 Angiogenèse par intussusception.

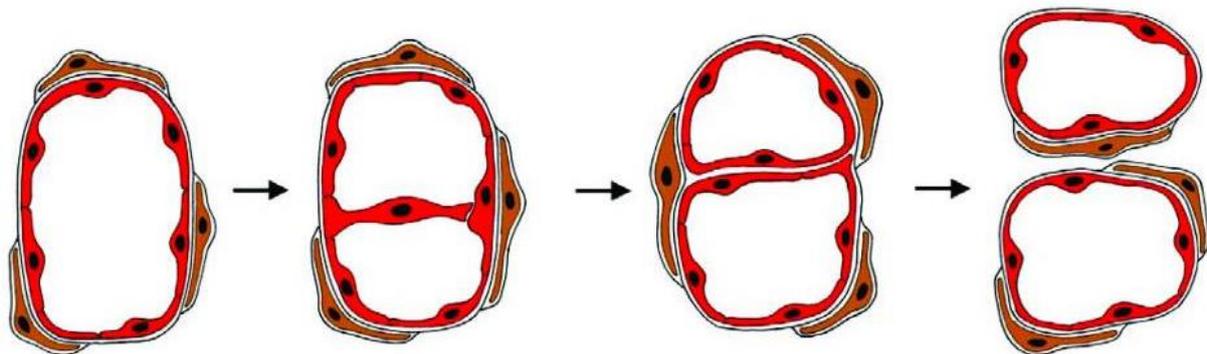
L'angiogenèse par intussusception est aussi appelée « splitting angiogenesis » ou intussusceptive microvascular growth (**Figure 4**). Elle permet de former des néo-vaisseaux par subdivision d'un large capillaire sinusoïdal en deux capillaires plus fins. Initialement décrit par Short et al. puis précisé par Burri en 1986 dans une étude des réseaux capillaires postnataux humains et de rats [23, 24]. Ils décrivent que le réseau capillaire pulmonaire

pouvait croître par « bourgeonnement » de cellules endothéliales à l'intérieur d'un vaisseau créant ainsi des ponts inter endothélial trans-capillaires.

Le mécanisme d'intussusception est impliqué dans l'expansion du lit vasculaire tumoral et la création de branchements entre les différents réseaux capillaires de la néo vascularisation [25–27].

Les mécanismes sous-tendant ce phénomène sont encore mal compris mais il semble motivé pour partie par les forces de cisaillement et les élévations du débit sanguin locorégional perçues par les cellules [24].

Figure 4. Angiogenèse par intussusception [28].



Formation d'un pont transcapillaire de cellules endothéliales ; formation d'une bicouche endothéliale ; réorganisation des jonctions interendothéliales ; formation d'une colonne interstitielle ou pilier envahi par les péricytes et myofibroblastes environnants ; croissance du pilier et formation d'une maille capillaire.

2.2.3.5 Vaisseaux tumoraux

La néovascularisation tumorale, même si elle est similaire dans ses mécanismes de formation à l'angiogenèse physiologique, conduit à un arbre vasculaire de nature différente. En effet, la vascularisation tumorale est tortueuse, chaotique et désorganisée avec des

branchements excessifs [29]. L'endothélium des vaisseaux tumoraux est discontinu, fenêtré, avec la présence de multiples ouvertures avec des trous transcellulaires [20]. De plus les vaisseaux sont dépourvus de péricytes [30]. Les vaisseaux sont donc plus perméables ce qui présente deux conséquences :

1) l'extravasation possible de cellules tumorales et donc leur dissémination métastatique ;

2) l'augmentation de la pression interstitielle, plus particulièrement au centre de la tumeur, qui entre en compétition avec la perfusion sanguine et limite ainsi les échanges entre le sang et le milieu interstitiel favorisant hypoxie et acidose stimulant plus encore la néo angiogenèse.

De plus, du fait de la croissance tumorale continue, cet arbre vasculaire tumoral est dynamique et plastique, avec de fréquentes variations d'architecture. Fonctionnellement, la vascularisation tumorale se distingue aussi de la vascularisation native [15]. En effet, la vascularisation tumorale est souvent hétérogène au sein de la même tumeur et de mauvaise qualité. Un tiers des vaisseaux tumoraux sont des fistules artérioveineuses (**Figure 5**).

Figure 5. Artériographie sélective de l'artère circonflexe humérale gauche



Hyper vascularisation anarchique d'une métastase osseuse humérale de cancer du rein (A). Visualisation précoce d'un retour veineux basilique et céphalique (B).

Ces communications artérioveineuses directes, sans interposition de capillaires, empêchent tout échange de métabolites et d'oxygène, entretenant l'hypoxie et l'acidose dans leur environnement immédiat [30]. Par ailleurs, l'absence de péricytes et l'innervation anarchique (ou absente) des vaisseaux empêchent toute régulation du débit local et toute participation à la régulation de la pression sanguine par les mécanismes habituels. Seules les artéioles préexistantes d'où sont issues les principaux vaisseaux tumoraux sont sujets aux régulations d'amont. Certaines portions des tumeurs sont donc ainsi soumises à de très faibles débits sanguins locaux aboutissant alors parfois à leur nécrose [31]. Cette nécrose au centre de la tumeur liée à l'absence de débit sanguin est contrebalancée par l'hypervascularisation périphérique. Enfin, des forces de pressions interstitielles élevées peuvent s'opposer dans ces régions aux pressions hydrostatiques, et limiter ainsi les échanges entre le sang et les cellules tumorales, favorisant aussi l'hypoxie, moteur essentiel de l'angiogenèse [32]. Ces mécanismes d'hypoxie et d'ischémie participent aussi à la résistance des tumeurs aux traitements systémiques comme à la radiothérapie [30, 33]. L'endothélium de cette

néovascularisation est devenu une cible privilégiée dans la recherche de nouvelles thérapies anti-tumorales. Ces cellules sont plus accessibles que les cellules tumorales elles-mêmes et sont plus stables génétiquement, et donc moins sujettes à développer des mécanismes de résistance. Il a de plus été démontré que le phénotype endothélial tumoral était similaire entre les différentes tumeurs et les différents vaisseaux sanguins normaux. Les vaisseaux sanguins tumoraux ont donc fait l'objet de recherches poussées, actives qui ont permis de comprendre de nombreux mécanismes impliqués dans le contrôle moléculaire de la néoangiogenèse.

Pour notre propos, on comprend donc que la nature de la circulation tumorale, son potentiel angiogénique et sa greffe sur un réseau vasculaire natif va entraîner des modifications hémodynamiques locales. Le nombre de vaisseaux et de micro vaisseaux augmentant en aval de l'artère native, afférente à l'organe sain et à la tumeur qui s'y développe provoque ainsi une chute de la résistance hémodynamique locale et une augmentation consécutive du débit sanguin local.

2.3 Imagerie de la réponse tumorale

2.3.1 Rationnel de l'évaluation et du suivi de la réponse tumorale à un traitement

L'arsenal de traitement des cancers est aujourd'hui vaste et comprend des traitements cytotoxiques, cytostatiques, anti-angiogéniques et l'immunothérapie. Le choix des traitements pharmacologiques des tumeurs se fait en fonction des données de la littérature, de l'agressivité du cancer, des comorbidités du patient et des réponses et toxicités attendues pour chaque patient. La prédiction de l'efficacité et de la tolérance d'un traitement relève donc d'un pari que fait l'oncologue à partir de toutes ces données. Le suivi longitudinal dans le temps du patient traité est multiparamétrique et a pour objectif de détecter précocement des signes cliniques, morphologiques et biologiques de réponse ou de progression afin d'adapter au mieux le traitement : maintenir le traitement en cas de réponse complète, l'intensifier en cas de réponse partielle, ou changer en cas de progression.

Le suivi clinique de tumeurs superficielles est réalisable par palpation et mesure au pied à coulisse. Le suivi biologique de certains cancers est rendu possible du fait de leur sécrétion de certains marqueurs tumoraux (antigène carcinoembryonnaire, antigène tumoral CA 125, 15-3, 19-9, alphafoetoprotéine...) quantifiable dans le sang. Enfin, le suivi morphologique par imagerie médicale est primordial car il permet de localiser et de quantifier les tumeurs primitives et les éventuelles récurrences. Ceci permettant d'affiner le suivi longitudinal de l'efficacité des traitements ainsi que d'envisager le cas échéant un traitement curatif : ablation ciblée ou résection d'organe ou d'une partie d'un organe. De plus il est important de maintenir une surveillance prolongée du patient en cas de récurrence de la maladie ou de réponse dissociée. En effet, les cancers sont le résultat de mutations génétiques d'une population cellulaire dont la prolifération échappe à tout contrôle par les mécanismes de régulation cellulaire habituels et par le système immunitaire. Ainsi, malgré d'excellentes réponses tumorales au traitement, il apparaît parfois des populations cellulaires tumorales qui

expriment un gène de résistance au traitement et qui échappe donc au contrôle de la maladie.

Ce suivi multiparamétrique comporte des limites, en effet la plupart des tumeurs n'ont pas de traduction clinique évidente et certaines tumeurs ne sécrètent pas de marqueurs tumoraux quantifiables en routine clinique. L'imagerie médicale a donc acquis une place de choix dans l'évaluation des traitements des tumeurs.

2.3.2 Critères morphologiques : RECIST

La méthode de référence d'évaluation des traitements anticancéreux a été définie en 1979 par l'organisation mondiale de la santé qui a retenu des critères basés sur la mesure bidimensionnelle des lésions en tomographie axiale assistée par ordinateur (TDM) ou en radiographie [34]. Ainsi, était établie une norme reproductible, standardisée d'évaluation afin de comparer les effets des traitements entre eux. En 2000 puis en 2009, ces critères ont été mis à jour afin de pallier les variations retrouvées dans les études [35]. Les critères RECIST 1.1 (response evaluation criteria in solid tumor) ne s'appliquent comme leur nom l'indique, qu'aux tumeurs solides et se basent quant à eux sur une mesure unidimensionnelle en coupe axiale sur une TDM (**Tableau 1**). La simplification des critères a permis une meilleure faisabilité et reproductibilité de la méthode [36].

Le principe est de dresser la liste exhaustive des lésions avant le début du traitement, qu'elles soient primitives ou secondaires. Ces lésions seront ensuite suivies sur les examens ultérieurs afin de déterminer si elles répondent ou non au traitement par la diminution de leurs diamètres (mesure quantitative pour les lésions cibles, qualitative pour les lésions non cibles). Deux types de lésion sont définis sur l'examen initial : les lésions cibles et les lésions non-cibles. Lors du suivi morphologique du patient, la réponse au traitement est évaluée selon l'évolution des lésions cibles et non-cibles. La réponse globale sera une combinaison des réponses précédentes : réponse complète, réponse partielle, maladie stable ou maladie

progressive. La réponse objective est évaluée par rapport à l'examen prétraitement, alors que la progression est définie par rapport à la plus petite somme des lésions cibles (nadir) [36].

Tableau 1. Critères RECIST 1.1 [36]

Tableau 1 Définitions et catégories de réponse pour chaque type de lésion selon RECIST 1.1.			
	Lésions cibles	Lésions non cibles	Nouvelles lésions
Définition	Lésions dont le plus grand diamètre est ≥ 10 mm et dont les limites sont suffisamment bien définies pour que leur mesure soit considérée comme fiable Ganglions : mesure du petit axe, lésion cible si son petit axe mesure ≥ 15 mm RECIST 1.1 : nombre maximum de lésions cibles choisies 5/patient et 2/organe	Lésions trop petites (< 10 mm) Lésions dont la mesure est considérée comme non fiable car leurs limites sont difficiles à définir (lésions osseuses, leptoméningées, ascite, épanchement pleural ou péricardique, lymphangite carcinomateuse...) Lésions mesurables mais non incluses dans les lésions cibles Ganglions : mesure du petit axe, lésion non cible si $10 \leq$ petit axe < 15 mm Marqueurs tumoraux $>$ normale (si pertinent et prédéfini)	
Réponse complète (CR)	Disparition de toutes les lésions cibles et tous les ganglions < 10 mm de petit axe	Disparition de toutes les lésions non cibles et normalisation des marqueurs tumoraux	Non (pas de nouvelle lésion)
Réponse partielle (PR)	$\geq 30\%$ de la somme des lésions cibles par rapport à la somme prétraitement	Pas de progression	Non (pas de nouvelle lésion)
Maladie stable (SD)	Ni réponse, ni progression	Persistance d'une ou de plusieurs lésions non cibles et/ou dosages de marqueur tumoraux $>$ normale	Non (pas de nouvelle lésion)
Maladie en progression (PD)	$\geq 20\%$ de la somme des lésions cibles par rapport à la plus petite somme mesurée au cours du suivi (nadir) et ≥ 5 mm en valeur absolue	Progression « non équivoque » (appréciée qualitativement) en taille des lésions (une seule lésion augmentant de taille ne suffit pas)	Oui (apparition de nouvelle[s] lésion[s] dont la nature secondaire est certaine)
La somme des lésions cibles est définie comme la somme des plus grands diamètres pour les lésions non ganglionnaires et du petit axe pour les ganglions.			

Cependant, les critères RECIST 1.1 ont des limites. Ils sont mal adaptés pour l'évaluation de certains organes (foie, os), certaines tumeurs et certains traitements. De plus, les seuils choisis (-30% pour la réponse et $+20\%$ pour la progression) l'ont été arbitrairement, sans faire l'objet d'une validation qui prouverait qu'ils reflètent effectivement le devenir du patient (par exemple, la survie globale). Il est même probable que le seuil (de

réponse ou de progression) significatif pour prédire des différences de survie chez des patients sous traitement soit différent en fonction du type de traitement et du type de cancer [36, 37]. Ainsi, les tumeurs des foies traités efficacement par anti-angiogéniques se nécrosent mais diminuent peu de taille. L'application des critères RECIST 1.1 concluent alors à tort à une maladie stable alors que la survie du patient est nettement prolongée. De même les thérapies focales guidées par l'imagerie comme la radiofréquence ou la chimioembolisation intra artérielle laissent des cicatrices de taille supérieure à la tumeur (correspondant aux marges de destruction thermiques) faisant conclure à tort à une progression. Dans la carcinose péritonéale, la plupart des implants sont <1cm et rendent alors les critères RECIST 1.1 non applicables. Enfin, certaines tumeurs répondent aux traitements en laissant des masses fibreuses cicatricielles qui ne contiennent pas de cellules tumorales. Ces masses sont donc considérées à tort comme des masses tumorales résiduelles alors que les patients ont une survie prolongée. C'est ainsi qu'est apparu un besoin de nouveaux critères de réponse, reflète plus fonctionnels que morphologiques du métabolisme des tumeurs et plus adaptés aux effets des différents traitements et aux différentes tumeurs non plus basés uniquement sur la taille des lésions mais aussi sur l'appréciation de leur vascularisation et sur la mesure de leur densité.

2.3.3 Critères « fonctionnels » / m-RECIST, Choi, Chun

Les effets des traitements ciblés anti-angiogéniques, comme l'imatinib utilisé dans les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST), ont pour conséquence de dévasculariser les tumeurs sans en modifier significativement la taille, voire en l'augmentant [38]. Les critères de Choi combinent les changements de densité des tumeurs exprimés en unités Hounsfield et/ou de taille pour déterminer la réponse tumorale (Fig. 3). Selon Choi et al. une réponse partielle est définie comme une diminution ≥ 10 % de la somme des tailles ou bien une

diminution ≥ 15 % de la moyenne des densités des lésions cibles mesurée par TDM après injection, tandis qu'une maladie progressive est définie comme une augmentation ≥ 10 % en taille sans répondre aux critères de réponse partielle sur le critère de densité. Chez les patients atteints de GIST traités par imatinib, les critères de Choi ont montré une corrélation significativement meilleure avec le taux de survie que les critères RECIST 1.1 [39]. Les critères de Choi ont été élargis à d'autres tumeurs traitées par anti-angiogéniques comme les cancers du rein avec des résultats plus variables [40–42]. D'autres critères ont alors suivis en ajoutant des critères de modifications densité aux critères morphologiques seuls : Choi modifiés, SACT, MASS [43, 44]. Cependant, en ajoutant des caractéristiques subjectives, ces critères se sont éloignés du concept initial de faisabilité et reproductibilité.

2.3.4 Cas particulier des lésions hépatiques

Les tumeurs hépatiques, en particulier le carcinome hépatocellulaire (CHC), ont en imagerie en coupe un aspect et un comportement spécifique qui ont révélé des insuffisances par rapport aux critères de surveillance RECIST 1.1. Le foie est un organe qui se caractérise par un double apport sanguin : la veine porte et l'artère hépatique dans des proportions respectives de 75 et 25% dans les conditions normales. L'apparition d'un CHC se fait généralement sur un foie de cirrhose. Au cours de la cirrhose, du fait de remaniements fibreux dans les espaces portes (lieu de mélanges des sangs issus de la veine porte et de l'artère hépatique) les rapports se modifient avec un apport hépatique sanguin provenant pour moitié de la veine porte et pour moitié de l'artère hépatique. Le CHC possède quant à lui une vascularisation artérielle hépatique exclusive. Cette caractéristique lui procure donc un aspect lors d'une imagerie en coupe dynamique avec injection de produit de contraste très spécifique dit de « wash-in » / « wash-out ». Ce dernier correspond à un rehaussement maximal au temps hépatique artériel qui disparaît comparativement au parenchyme hépatique adjacent lors des

phases veineuses et tardives. Cet aspect si particulier a rendu caduque la nécessité de preuve histologique au diagnostic radiologique [45, 46]. L'utilisation de thérapies ciblées et de thérapies guidées par l'imagerie concoure à la modification de l'aspect des carcinomes hépatocellulaires, en particulier avec l'apparition d'une hétérogénéité de rehaussement. Ainsi la persistance d'une portion rehaussée sur les phases précoces est en rapport avec un reliquat tumoral tandis que d'autres portions, non rehaussées, correspondent à une bonne réponse au traitement. Il a donc été suggéré de ne prendre en compte que les portions jugées viables de la tumeur c'est-à-dire les portions se rehaussant après injection. Ces critères EASL (European association for the study of liver disease) et modified-RECIST prennent donc en compte la somme des plus grands diamètres de la portion rehaussée (**Tableau 2**).

Il existe plusieurs limites à l'emploi des critères utilisant la densité. Les délais d'acquisition après injection de l'agent de contraste intraveineux (artériel précoce, artériel tardif, portal et tardif) sont variables en fonction des pratiques des centres et doivent être respectés et reproductibles afin de ne pas introduire de pseudo-modifications liées à la technique et non à un changement tumoral sous thérapie. De plus, l'injection de produit de contraste peut ne pas être possible chez un certain nombre de patients porteurs de cancers, qui combinent souvent plusieurs facteurs de risque d'insuffisance rénale.

Tableau 2. Critères modified-RECIST [36]

Tableau 3 Définitions et catégories de réponse pour les lésions de carcinome hépatocellulaire selon mRECIST.			
	Lésions cibles	Lésions non cibles	Nouvelles lésions
Définition	CHC Plus grand diamètre ≥ 10 mm Nodulaire (bien limité, non infiltrant) Rehaussement au temps artériel sur TDM ou IRM Pour autres localisation : id. RECIST	CHC : lésion trop petite (< 10 mm), infiltrante, ou de rehaussement atypique (non artériel) Pour autres localisations : id. RECIST	
Réponse complète (CR)	Disparition de tout rehaussement artériel intra-tumoral dans toutes les lésions cibles	Id. RECIST	Non (pas de nouvelle lésion)
Réponse partielle (PR)	$\geq 30\%$ de la somme des diamètres des portions viables (rehaussement à la phase artérielle) des lésions cibles par rapport à la somme prétraitement	Id. RECIST	Non (pas de nouvelle lésion)
Maladie stable (SD)	Ni réponse, ni progression	Id. RECIST	Non (pas de nouvelle lésion)
Maladie en progression (PD)	$\geq 20\%$ de la somme des diamètres des portions viables (se rehaussant) des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres des portions viables des lésions cibles depuis le début du traitement (nadir)	Id. RECIST	Oui (apparition de nouvelle[s] lésion[s] pour laquelle[lesquelles] le diagnostic de CHC est certain ^a) Oui (apparition de nouvelle[s] lésion[s] pour laquelle[lesquelles] le diagnostic de lésion secondaire est certain)

CHC : carcinome hépatocellulaire.
^a Un nodule hépatique nouvellement apparu sera classé comme CHC – et sera donc déclaré comme une progression – lorsque son plus grand diamètre est ≥ 10 mm et qu’il présente le rehaussement typique du CHC sur l’imagerie dynamique, c’est-à-dire une prise de contraste à la phase artérielle avec lavage au temps portal ou tardif. Les lésions ≥ 10 mm qui ne présentent pas une dynamique de rehaussement typique peuvent être diagnostiquées comme CHC si elles augmentent de taille de ≥ 10 mm sur les examens ultérieurs. Dans ce dernier cas, la date de progression retenue a posteriori sera la première date d’apparition de la lésion.

2.3.5 Cas particulier des malformations artérioveineuses superficielles (MAVS) de la face

La MAV est la conséquence d'un défaut de développement du réseau artériolo-capillaire entre artères et veines aboutissant à la formation de communications artérioveineuse directes : les « shunts ». Dans une MAV, la succession artère-artériole-capillaire-veinule-veine, est donc remplacée par la juxtaposition de shunts formant le « nidus ». En cas de MAV, l'absence d'interposition des artérioles à forte résistance hémodynamique entre les systèmes artériel et

veineux entraîne une circulation sanguine à haut débit et l'établissement de vitesses circulatoires élevées depuis le versant artériel en amont de la MAV jusqu'au système de retour veineux en aval.

L'évolution des MAV superficielles de la face est variable d'un patient à un autre et pour un même patient variable en fonction du temps. Certaines malformations peuvent être « dormantes » pendant plusieurs années puis devenir cliniquement visibles suite à un microtraumatisme (choc, traumatisme ou traitement inapproprié) [47] une stimulation hormonale (poussée pubertaire, grossesse) ou spontanément [47, 48]. L'augmentation de volume les rend symptomatiques avec survenue de douleurs, de saignements, d'un effet de masse et surtout d'un préjudice esthétique pouvant devenir important. La chirurgie d'exérèse et l'embolisation (obstruction des artères alimentant la lésion par du matériel étranger à type de colle ou billes) constituent l'arsenal thérapeutique des MAV superficielles. Cependant, ces traitements peuvent, dans de mauvaises indications, stimuler la croissance de la MAV.

La décision thérapeutique dépend actuellement de l'âge du patient, de l'aspect clinique de la MAV, de sa localisation, de son évolutivité, de son angio-architecture et de l'envahissement en profondeur des tissus sains. Une MAV est décrite cliniquement en 4 stades successifs selon la classification proposée par Schobinger en 1995.

Classification de Schobinger :

- Stade I, phase quiescente : tache cutanée rose ou bleutée (« faux angiome plan »), chaude, avec un shunt artério-veineux confirmé à l'échographie Doppler
 - Stade II, phase d'expansion : majoration de la lésion qui devient pulsatile, avec un thrill et un réseau veineux tendu et tortueux

- Stade III, phase de destruction : stade II compliqué de lésions cutanées avec nécrose, infection, hémorragies et douleurs
- Stade IV, phase de décompensation : stade III avec insuffisance cardiaque.

Cependant ces critères ont des limites. La distinction entre la phase quiescente et la phase d'expansion est avant tout clinique, difficilement mesurable et quantifiable lors d'un suivi longitudinal. Or c'est lors de la phase d'expansion qu'une intervention thérapeutique semble le moment le plus approprié. Le patient est alors asymptomatique et il est important de sélectionner les patients chez qui le traitement serait le plus approprié afin d'éviter d'exposer inutilement les patients porteurs de MAV quiescentes à des traitements potentiellement générateurs de complications. De plus, lors de traitements incomplets de volumineuses MAV, il n'existe pas de critères précis de suivi longitudinal et de détection de l'apparition d'une récurrence.

2.3.6 Cas particulier de la carcinose péritonéale

La carcinose péritonéale correspond à une dissémination au sein de la cavité péritonéale de toute tumeur dont l'origine n'est pas le péritoine. La carcinose péritonéale est aussi souvent le stade terminal de la maladie en oncologie digestive et gynécologique. La surface péritonéale est le second site anatomique de dissémination des cancers gastriques, colorectaux et ovariens. Le diagnostic et le suivi de la carcinose péritonéale sont primordiaux. En effet, l'avènement de thérapeutiques efficaces comme la péritonectomie de réduction tumorale complétée d'une chimiothérapie hyperthermie intrapéritonéale, requiert un diagnostic précoce avec évaluation de l'extension et de la localisation permettant d'anticiper les ablations d'organe avant que celles-ci ne s'avèrent trop délabrantes ou engageant le pronostic vital des patients. Les critères morphologiques s'appliquent mal dans le cadre de la carcinose péritonéale, pour plusieurs raisons : tout d'abord la taille des implants de carcinose est souvent < 1cm, ceci correspondant alors dans les critères RECIST 1.1 classiques à des lésions non-cibles. Ensuite, il existe différents types de carcinose péritonéale dont certaines sont mucineuses, liquidiennes, constitutives du pseudo myxome péritonéal, et la mesure d'un nodule n'est alors pas le reflet de l'extension de la maladie. Par ailleurs, la taille des implants et leur nombre n'est pas le reflet de la résécabilité et donc de la survie des patients. Enfin 50% des patients décéderont sans présenter d'autres sites métastatiques.

Au point de vue de l'imagerie médicale, la TDM abdominale reste l'examen recommandé d'évaluation de la carcinose péritonéale. L'évaluation de la carcinose péritonéale en imagerie est calquée sur l'évaluation chirurgicale préopératoire. Il a donc été développé des scores permettant de quantifier et d'évaluer la carcinose péritonéale. Ainsi le score le plus utilisé est le score de Sugarbaker (**Figure 6**) [49, 50], l'index de carcinose péritonéal (ICP). L'abdomen est divisé en 9 régions et l'intestin grêle en 4 segments (jéjunum proximal et distal, et iléon proximal et distal). La taille de la masse tumorale est évaluée dans chaque

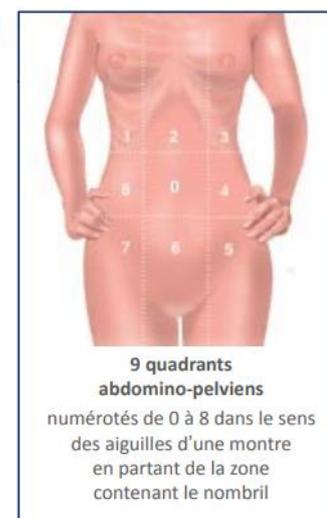
région et segment avec une échelle semi-quantitative allant de 0 à 3 (0 : pas de tumeur, 1 : tumeur de moins de 0.5cm, 2 : tumeur mesurant entre 0.5 et 5cm, 3 : tumeur de plus de 5 cm ou plage confluente). Le score varie donc de 0 à 39. Dans son analyse, Sugarbaker montre que les patients avec un ICP<20/39 ont un pronostic amélioré par la traitement chirurgical du fait de la possibilité d'une exérèse complète [50].

Figure 6. Index de Carcinose Péritonéale de Sugarbaker.

Régions abdomino-pelviennes prises en compte pour le calcul du score PCI (1,2)

0 - Central	Incision médiane, grand épiploon, côlon transverse
1 - Hypochondre droit	Glisson du lobe droit, péritoine diaphragmatique de la coupole droite, espace rétro-hépatique droit
2 - Épigastre	Graisse épigastrique, lobe gauche du foie, petit épiploon, ligament falciforme
3 - Hypochondre gauche	Péritoine diaphragmatique de la coupole gauche, rate, queue du pancréas, faces antérieure et postérieure de l'estomac
4 - Flanc gauche	Côlon gauche, gouttière pariéto-colique gauche
5 - Fosse iliaque gauche	Côlon sigmoïde, paroi pelvienne gauche en dehors du sigmoïde
6 - Pelvis	Utérus, trompes, ovaires, vessie, cul de sac de Douglas, recto-sigmoïde
7 - Fosse iliaque droite	Paroi pelvienne droite, cæcum, appendice
8 - Flanc droit	Côlon ascendant, paroi pelvienne et abdominale droite

1. Sugarbaker, 1995 ; 2. Chéreau, 2010.



L'évaluation de l'ICP radiologique par TDM est aujourd'hui la règle mais cette évaluation souffre de certaines limites. En effet, la détection des implants varie avec une sensibilité de 25 à 96% en fonction des régions étudiées et de la taille des implants [51–55]. Marin et al. rapporte une sensibilité de 43% pour la lésion de moins de 5 mm, de 100% pour les lésions de plus de 5 cm et de 87% pour les lésions intermédiaires [55]. De même, la

sensibilité de détection des implants est meilleure dans certaines régions : 100% dans la partie antérieure de l'abdomen et la surface hépatique et 40% dans le petit omentum ou sur la paroi de l'intestin grêle. La spécificité était élevée dans toutes les régions sauf les segments mésentériques. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut elle aussi être utilisée en complément de la TDM, améliorant ainsi ses performances de détection notamment pour les tumeurs mucineuses, en particulier dans le cas du pseudomyxome péritonéal [56–58]. En effet, les implants de tumeurs mucineuses contiennent une grande proportion d'eau et se voient donc particulièrement bien en IRM. Il semble que l'interprétation de l'IRM soit plus ardue et nécessite l'expérience d'un lecteur sénior travaillant dans un centre spécialisé [58].

2.4 Hémodynamique

2.4.1 Pression hémodynamique, tension pariétale

2.4.1.1 Au niveau de l'organisme

2.4.1.1.1 La boucle circulatoire

Le système circulatoire comprend une grande circulation ou circulation systémique, située entre le cœur gauche et le cœur droit. L'aorte et les artères de conduction puis de distribution assurent l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus et aux organes, les veines drainent le sang qui a participé aux échanges capillaires vers le cœur droit. Le système circulatoire comprend aussi une petite circulation ou circulation pulmonaire, située entre le cœur droit et le cœur gauche qui apporte le sang désaturé aux poumons, lieu de l'hématose. Les veines pulmonaires drainent le sang oxygéné par les poumons vers le cœur gauche d'où il est éjecté dans l'aorte et la grande circulation vers l'ensemble de l'organisme. C'est le travail et la force de contraction du ventricule gauche (création d'une pression hémodynamique et d'un débit) qui pousse le sang tout le long de la circulation systémique.

2.4.1.1.2 Circulation systémique

La circulation systémique se décline en différentes circulations locales placées en parallèle les unes par rapport aux autres. La pression hémodynamique à l'entrée de chacune est donc la même : il s'agit de la pression artérielle. La pression hémodynamique à la sortie de chacune est aussi identique : il s'agit de la pression veineuse centrale. Ainsi, c'est le niveau de la résistance hémodynamique locale qui ajuste le niveau de débit sanguin qui traversera chaque circulation locale (loi de Poiseuille).

Le débit cardiaque est la somme des débits sanguins locaux, destinés à chaque organe. C'est la valeur relative de la résistance hémodynamique locale qui va s'opposer plus ou moins

fortement à l'écoulement du sang dans chacune des circulations locales qui va établir le niveau du débit sanguin local, donc la distribution du débit cardiaque. La modification de cette valeur relative entraîne une « redistribution du débit cardiaque ».

Comme la résistance artériolaire systémique est très élevée, le ventricule gauche doit créer une pression hémodynamique élevée (de type artérielle) pour forcer le barrage artériolaire, sa résistance, afin d'assurer le débit cardiaque. Après passage du barrage artériolaire, les pressions hémodynamiques sont faibles dans les capillaires systémiques. Comme ils n'offrent que peu de résistance hémodynamique, la chute de pression est faible, elle reste parfaitement suffisante pour assurer le retour veineux jusqu'au cœur droit, l'oreillette droite, où la pression est presque nulle (pression veineuse centrale).

La finalité du système cardiovasculaire est ainsi d'assurer un débit cardiaque délivré à pression artérielle suffisante pour couvrir les besoins métaboliques de l'ensemble de l'organisme, de chaque organe. Le système cardiovasculaire remplit ses fonctions en maintenant l'homéostasie du débit cardiaque (Q_c) qui varie en fonction de ses deux facteurs d'adaptation que sont :

- 1) Le volume d'éjection systolique (VES)
- 2) La fréquence cardiaque (FC)

La régulation de la pression artérielle (PA) s'équilibre avec le débit cardiaque grâce au niveau de résistance systémique totale (RST), dépendant directement des niveaux de résistance hémodynamique élevée à l'étage de chaque organe. Le système fonctionnant « en boucle », l'homéostasie n'est assurée que grâce à un retour veineux efficace qui alimente le cœur, afin qu'il maintienne son débit et la pression artérielle.

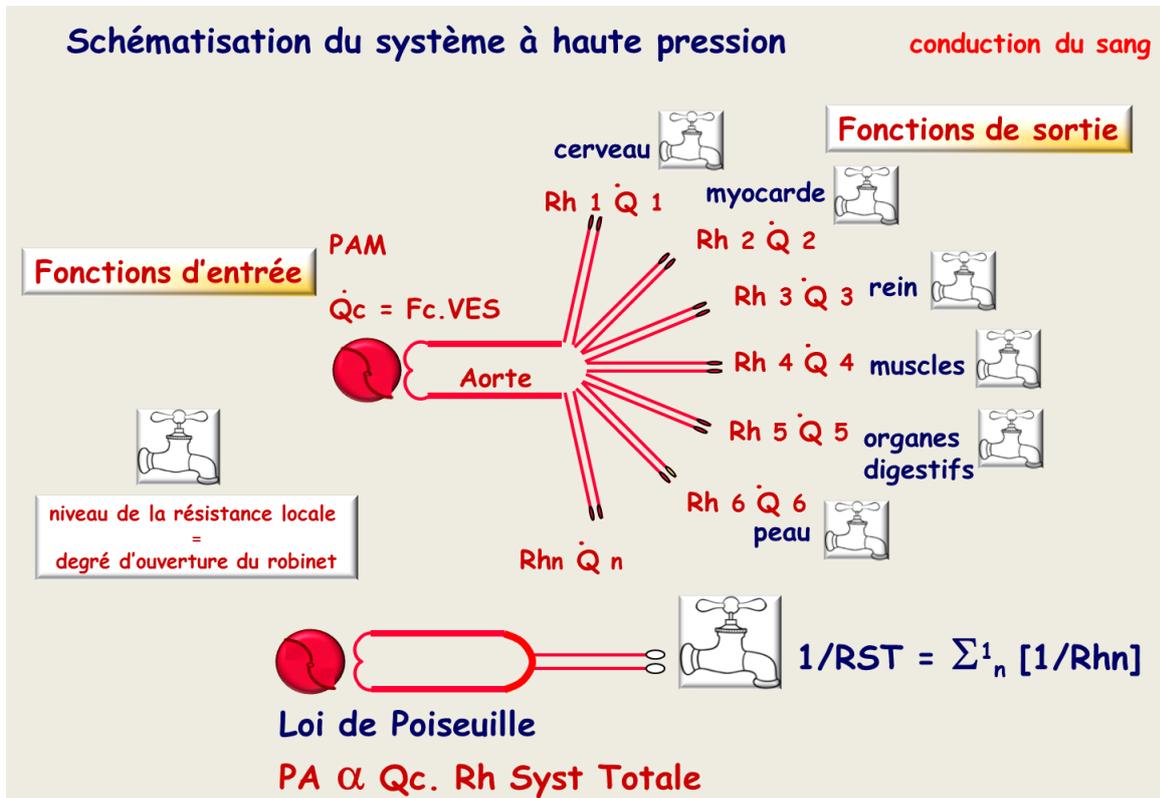
Ainsi, la contraction cardiaque (systole) génère une énergie potentielle ou pression hémodynamique dans les artères (force exercée par unité de surface) exprimée en millimètre de mercure.

$$PA = VES \times FC \times RST.$$

La pression artérielle résulte du produit du débit cardiaque par la RST. A l'état basal, le débit cardiaque variant peu, ce sont les résistances périphériques qui se modifient, fluctuent pour maintenir le niveau de pression sanguine (**Figure 7**).

$$PA = Qc \times RST.$$

Figure 7. Schématisation d'un système à haute pression [59].



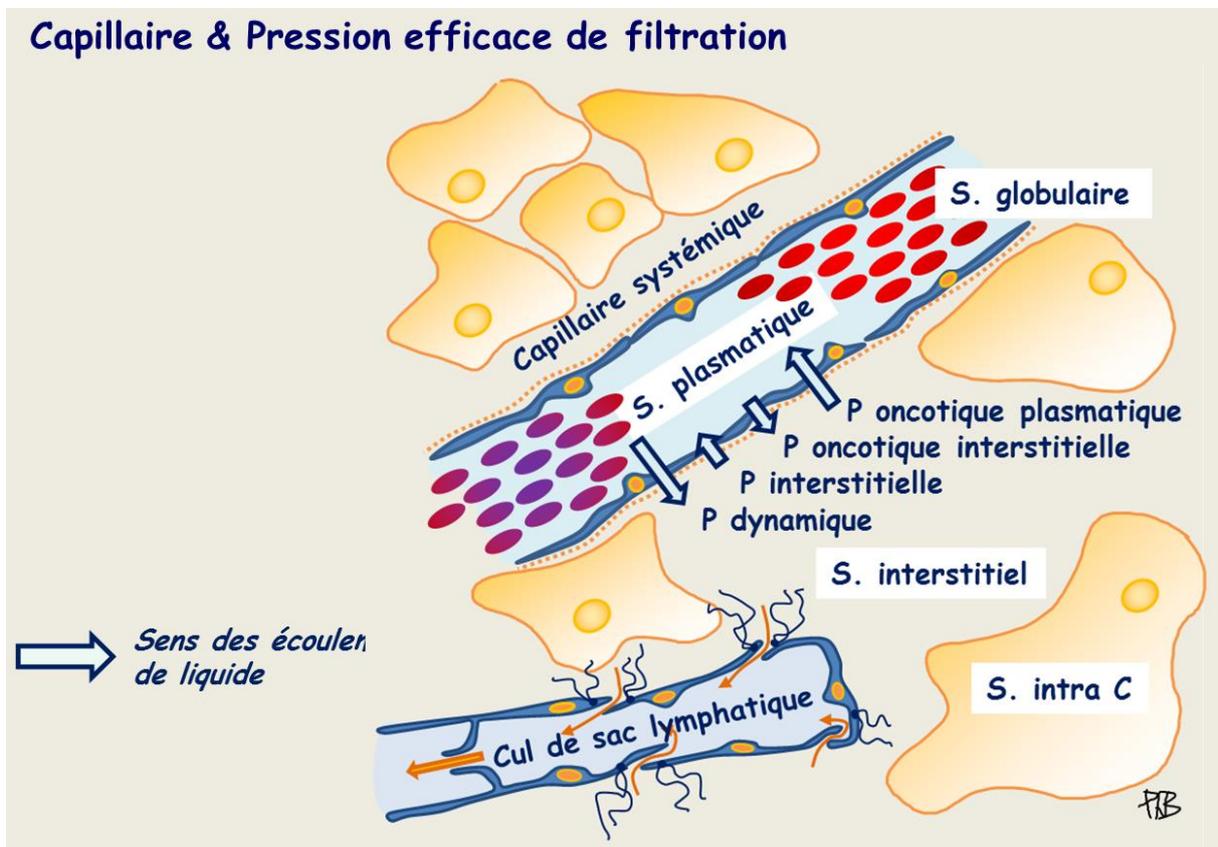
2.4.1.2 *Au niveau de l'organe*

Le tonus vasomoteur des cellules musculaires lisses va modifier le diamètre des artérioles et donc, selon la loi de Poiseuille, réguler le niveau de pression sanguine. Le système nerveux autonome, et particulièrement sa branche sympathique, règle le niveau de la RST pour maintenir la pression artérielle à l'étage de l'organisme afin de maintenir la pression de perfusion de tous les organes. Une fois que l'homéostasie de la pression artérielle est assurée, il existe un ajustement possible à chaque organe : la résistance hémodynamique locale peut être modulée par phénomène de vasomotricité, pour ajuster le débit sanguin local et les apports nutritifs. Cet ajustement se fait sous contrôle du système nerveux autonome, c'est-à-dire dans des limites qui ne déséquilibrent ni la résistance systémique totale, ni le niveau de pression artérielle donc de pression de perfusion de tous les organes.

Le réseau capillaire distal qui fait communiquer les artérioles et les veinules est constitué d'une matrice extracellulaire et d'une monocouche de cellules endothéliales assez fine pour permettre les échanges d'eau, de gaz dissous, d'ions et de molécules nécessaires au métabolisme des organes. Les transferts diffusifs intéressent les petites molécules gazeuses, les glucides, les lipides et acides aminés et s'effectuent librement, suivant un gradient de concentration, le long du capillaire, jusqu'à équilibre des concentrations de part et d'autre de la barrière capillaire. Les transferts de liquides sont régis par l'*Equilibre de Starling* ou équilibre entre les pressions hémodynamiques et les pressions oncotiques, c'est à dire les pressions osmotiques dues aux différences de concentration en protéines de part et d'autre de la barrière capillaire ; les protéines étant des molécules de haut poids moléculaire ne traversant pas librement cette barrière. Le maintien d'une résistance artérielle élevée est fondamental pour abaisser la pression hémodynamique capillaire et éviter la fuite de liquide dans l'interstitium. La différence de pression hémodynamique entre le pôle artériolaire et le pôle veinulaire du capillaire systémique permet le passage de liquide vers l'interstitium à

l'entrée du capillaire et sa réintégration dans le secteur plasmatique à sa sortie (**Figure 8**). Une paroi capillaire incomplète ou altérée, la présence de micro vaisseaux néoformés sans sphincter pré-capillaire efficace, modifient l'équilibre des forces au sein des tumeurs provoquant un œdème et une augmentation des pressions tissulaires, et, secondairement un collapsus des vaisseaux, une ischémie au centre des tumeurs ou métastases [31, 32].

Figure 8. Capillaire et pression efficace de filtration [59].



L'adaptation du débit sanguin local aux modifications des besoins métaboliques se fait grâce aux phénomènes de recrutement micro vasculaire et de vasomotricité artériolaire modifiant ainsi la valeur de la résistance hémodynamique locale. Certains territoires en situation de besoin métabolique recrutent et se vasodilètent, tandis que d'autres sans grand besoin se vasoconstrictent et la valeur de la RST se modifie peu. Ainsi, la pression artérielle

est peu impactée et le débit cardiaque reste plus ou moins stable mais redistribué par le jeu de la modification relative des résistances hémodynamiques locales. Cette redistribution ne nécessite alors aucun travail cardiaque supplémentaire. Par contre, si la redistribution est insuffisante, que la RST s'abaisse, le débit cardiaque doit augmenter pour maintenir, voire augmenter la pression artérielle et la pression de perfusion d'organe. C'est le rôle du système nerveux autonome et particulièrement de sa branche sympathique de stimuler la contraction cardiaque pour augmenter la force de contraction ventriculaire gauche et la fréquence cardiaque pour augmenter le débit cardiaque. La régulation nerveuse de la pression artérielle assure alors la modification harmonieuse des valeurs de débit cardiaque, de résistances hémodynamiques locales (donc de la RST et de la pression artérielle) pour assurer l'homéostasie hémodynamique centrale et périphérique même en conditions d'augmentation du métabolisme comme en cas d'exercice physique par exemple. Certaines situations pathologiques s'accompagnent d'une baisse de la résistance hémodynamique locale comme la création d'un lit vasculaire néoformé en cas de MAV. En cas de développement important, ces lits vasculaires anormaux peuvent avoir un impact sur la valeur de la RST et obliger à une augmentation permanente du débit cardiaque comme par exemple au stade 4 de la classification de Schobinger.

2.4.1.3 Circulation hépatosplanchnique (cas particulier)

Les vaisseaux mésentériques irriguent un système capillaire entérique (intestins) que draine la veine mésentérique supérieure; cette veine conflue avec la veine splénique (rate) pour donner la veine porte. La veine porte se résout en un second réseau capillaire sinusoidal dans le foie que drainent les veines sus-hépatiques vers la veine cave inférieure. On comprend l'importance de cette disposition circulatoire particulière pour assurer les phénomènes métaboliques de digestion : les nutriments sont absorbés au travers de la barrière intestinale et

drainés directement vers les hépatocytes, sans passage systémique, pour transformation et stockage puis libération différée.

2.4.2 Vitesse et débit

Le cœur confère au sang une énergie potentielle (pression hémodynamique) et une énergie cinétique sous forme de vitesse sanguine dans toutes les artères, les artères de conduction et de distribution. Pour une vitesse donnée, le débit sanguin dans un vaisseau rectiligne sans bifurcation, soumis à un gradient de pression donné, est déterminé par sa surface de section :

$$Q = S \times v$$

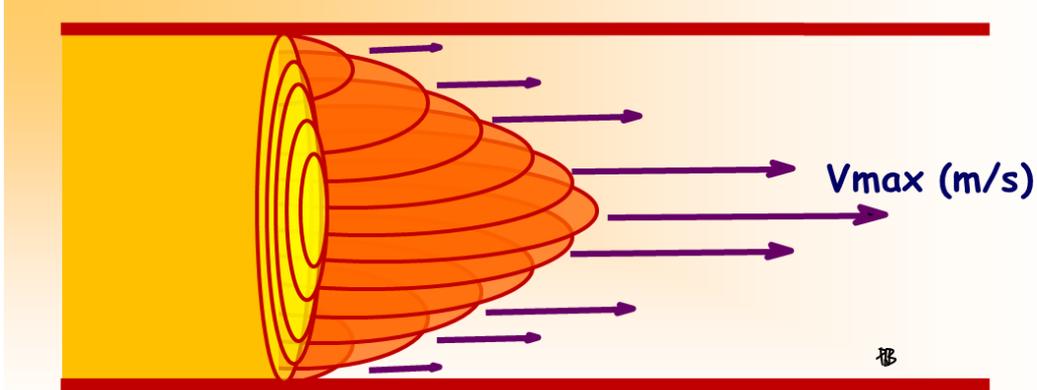
- Où
- Q est le débit sanguin local, en ml/s
 - v la vitesse sanguine, en cm/s.
 - S la section orthogonale de ce vaisseau, en cm².

En raison des forces de friction du sang sur l'endothélium vasculaire et des forces de frottement internes du sang, liées à sa viscosité, la vitesse n'est pas uniforme dans la lumière artérielle ; elle est plus élevée au centre du courant sanguin qu'au contact de l'endothélium.

Dans le cas d'un vaisseau rectiligne et de section régulière parcouru par un débit constant relativement faible, l'écoulement sanguin est laminaire, c'est-à-dire qu'il se fait selon des lignes de courant stables. Cet écoulement obéit alors à la loi de Poiseuille et son profil de vitesse est parabolique (**Figure 9**).

Figure 9. Profil d'écoulement parabolique d'un fluide idéal [59].

Profil des vitesses circulatoires dans une artère



Profil des vitesses parabolique (flux laminaire)

Profil des vitesses circulatoires dans une artériole



Profil des vitesses turbulent (turbulo-laminaire)

Loi de Poiseuille :

$$Q_v = \frac{\Delta P \pi R^4}{8 \mu L}$$

- Q_v = débit dans le vaisseau considéré, en ml/s
- R = rayon du vaisseau, en cm
- ΔP = différence de pression à l'entrée et à la sortie du vaisseau considéré, en mmHg
- L = longueur du vaisseau considéré, en cm
- μ = viscosité sanguine, en Poise

Au niveau des bifurcations artérielles et des sténoses, l'écoulement sanguin devient turbulo-laminaire, voire rétrograde sur certaines parties de la surface de section artérielle. Les conditions qui déterminent l'aspect laminaire ou turbulo-laminaire d'un écoulement sont fonction de sa vitesse v , (en cm/s), du diamètre du vaisseau considéré (d en cm), de la viscosité sanguine (μ , en Poise) et de la masse volumique du sang (ρ , en g/cm^3). Le nombre de Reynolds (Re) est un nombre sans dimension qui exprime l'importance relative des forces d'inertie par rapport aux forces visqueuses. Il renseigne sur la stabilité de l'écoulement :

$$Re = \frac{vd\rho}{\mu}$$

Lorsque le nombre de Reynolds est inférieur à 2300, l'écoulement est laminaire. Lorsque le nombre de Reynolds est supérieur à 2300, l'écoulement peut devenir turbulent. C'est le cas dans les premiers centimètres de l'aorte thoracique en raison de la vitesse d'éjection à la sortie du ventricule gauche. Les modifications brutales ou importantes de la géométrie qui caractérisent les sténoses sévères, les bifurcations, l'entrée dans les collatérales ou autres obstacles à l'écoulement, peuvent être à l'origine d'instabilités localisées par augmentation soudaine des vitesses.

2.4.3 Tension pariétale

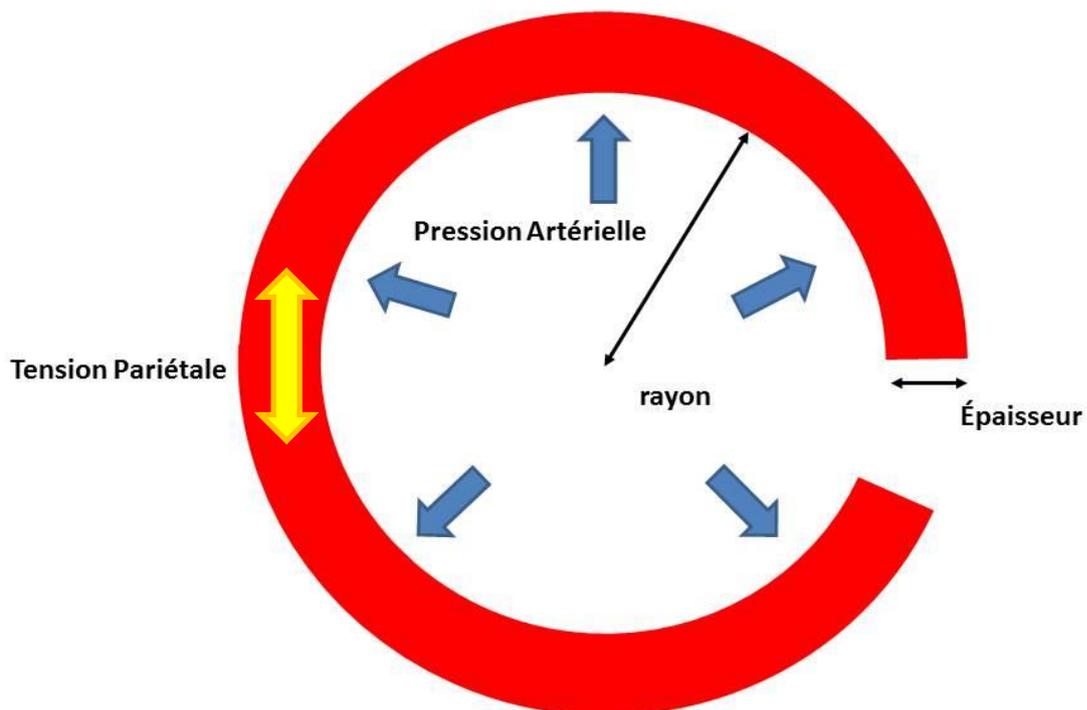
La pression sanguine exerce sur les parois des vaisseaux une force perpendiculaire à la surface endoluminale (**Figure 10**). Ces forces sont compensées par des forces intrapariétales radiales et tangentielles exercées par les différents éléments de la paroi et s'opposant aux effets de distension de la pression sanguine. Dans certain organe, la pression externe au vaisseau peut ne pas être nulle et c'est alors la différence de pression interne et externe au

vaisseau ou pression transmurale qui entre en jeu. Ainsi, dans la direction radiaire, la tension pariétale T est liée à la pression sanguine transmurale (P, en mmHg) et au rayon du vaisseau (r, en cm) par la loi de Laplace :

$$T = P \times r$$

Elle s'exprime mmHg.cm.

Figure 10. Représentation de la loi de Laplace sur un tube circulaire de longueur très supérieure à son rayon. La tension pariétale est le produit de la pression transmurale par le rayon interne.



2.4.4 Force de cisaillement et remodelage artériel

Lorsque le sang s'écoule, il exerce une force de friction à la surface endothéliale. Cette force se traduit par une contrainte dite de cisaillement (τ) sur la paroi vasculaire qui est définie comme le produit de la viscosité du sang et du gradient de vitesse sanguine.

La contrainte de cisaillement transmise à l'endothélium par le courant sanguin tend à déplacer l'endothélium et la couche intimale dans la direction de l'écoulement. Dans le cas d'un écoulement laminaire, la contrainte de cisaillement τ est égale à

$$\tau = \frac{4\mu v}{r}$$

- Où μ représente la viscosité sanguine, en Poise
- r le rayon vasculaire, en cm
- v la vitesse sanguine maximale au centre du vaisseau, en cm/s

Elle s'exprime en dyne/cm².

La contrainte de cisaillement ou Wall Shear Stress (WSS) des anglo-saxons est adaptée dans des limites de normalité en fonction du diamètre circulant donc de la distance par rapport au cœur. Le WSS est de 8 à 10 dynes/cm² pour les grosses artères de conduction, il s'élève jusqu'à des valeurs de 40 à 50 dynes/cm² pour les artères de petit calibre et les artérioles [60].

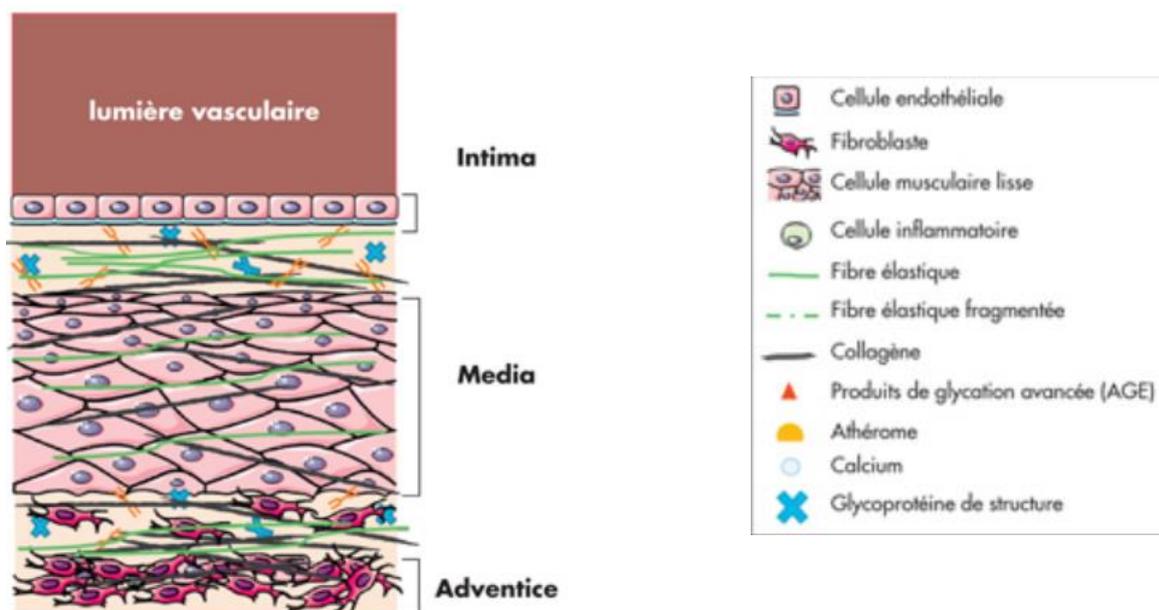
2.5 Structure compartimentale du vaisseau

Elle comprend trois secteurs :

- 1) Endoluminal, composé de cellules sanguines et endothéliales, de peptides et de protéines plasmatiques ;
- 2) Médial, composé de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire ;
- 3) Adventitial, composé de tissu conjonctif et de terminaisons nerveuses capillaires

(Figure 11).

Figure 11. Structure compartimentale d'un vaisseau sanguin artériel



2.5.1 Endothélium

L'intima est successivement composé de l'endothélium, de la membrane basale et de sa couche sous-endothéliale puis de la limitante élastique interne.

Les cellules endothéliales sont orientées dans le sens des forces de cisaillement qui leur est appliquée [61]. La surface luminale des cellules endothéliales est recouverte d'un

glycocalyx chargé négativement dont le rôle essentiel est anticoagulant. Le transport endothélial se fait par transcytose et le passage des petites molécules au travers de la barrière endothéliale se fait par les espaces intercellulaires. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées (tight junctions) et des nexus (gap junctions). Les cellules endothéliales peuvent se contracter sous l'effet d'agents vasoactifs tels que la thrombine, les catécholamines, l'histamine, la sérotonine, l'angiotensine II ou la sérotonine. La contraction des cellules endothéliales induit un élargissement des espaces intercellulaires et donc une augmentation de la perméabilité endothéliale. Le taux de renouvellement cellulaire est faible, de l'ordre de 1-2 cellules pour 1000 cellules endothéliales par jour, mais peut aller jusqu'à 10 pour 100 cellules par jour dans des régions soumises à des contraintes de cisaillement élevées. Les cellules endothéliales influencent la vasomotricité et la prolifération des cellules musculaires lisses. L'endothélium joue un rôle essentiel d'interface entre le sang circulant (protéines plasmatiques, peptides, cellules sanguines) et la média de la paroi artérielle responsable de la vasomotricité. Il transmet les messages de la phase plasmatique à la phase viscoélastique de la média.

La lame basale est composée de micro fibrilles de collagène de type IV et de glycoprotéines. Elle constitue le support et le guide de la régénération de l'endothélium.

La couche sous-endothéliale est occupée par des fibres conjonctives de l'élastine et du collagène, des protéoglycanes et quelques cellules musculaires lisses.

La limitante élastique interne est une couche fenêtrée de tissu élastique d'environ 70 à 100 nm d'épaisseur.

2.5.2 Média

La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses et de matrice extra cellulaire. Cette dernière est composée de fibres élastiques, de fibrilles d'élastine, de faisceaux et fibrilles de collagène, et de protéoglycanes. On peut distinguer les artères de conduction ou artères élastiques et les artères de distribution ou artères résistives.

Les artères de conductance (aorte et les premières branches collatérales) se caractérisent par une proportion relative de fibres élastiques plus importante que la proportion de fibres musculaires. Cette particularité confère à la paroi de ces artères une compliance artérielle basse. Les fibres élastiques s'opposent à une déformation trop importante sous l'effet de la pression artérielle systolique et maintient la structure du vaisseau pendant la diastole.

Les artères de distribution (des artères de petit calibre jusqu'aux artérioles) ont quant à elles une proportion de fibres musculaires croissante, de manière inversement proportionnelle à leur calibre. Cette particularité confère à ces artères des propriétés de vasomotricité permettant la dilatation en cas d'augmentation transitoire de débit sanguin local [62]. Cette propriété est aussi le vecteur et le stimulus principal des phénomènes de remodelage vasculaire en cas de modification permanente du débit sanguin local réglé par le niveau de la résistance hémodynamique locale.

2.5.2.1 Cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses de la média sont le déterminant de la vasomotricité et de la vasotrophicité artérielle. En sus, les cellules musculaires lisses sécrètent des protéines permettant de communiquer avec la matrice extracellulaire et les cellules environnantes. Il existe une grande hétérogénéité dans l'expression phénotypique de ces 3 fonctions des cellules musculaires lisses en situation normale et au cours des différents processus

pathologiques. Ainsi, au cours de l'athérosclérose il existe une migration des cellules musculaires lisses vers l'endothélium s'accompagnant alors d'une expression phénotypique de type myofibroblastique responsable d'une perte du potentiel contractile au profit d'une fonction sécrétoire. De façon similaire, lors d'une mise en culture cellulaire la fonction contractile des cellules musculaires lisses de la média disparaît au profit de la fonction sécrétoire qui varie en fonction des phases prolifératives ou quiescentes.

La contraction des cellules musculaires lisses de la média passe par la création de ponts actine-myosine. Ces interactions entre protéines contractiles sont inexistantes lors de la phase de relaxation complète. Cette contraction est dite tonique par opposition à la contraction rythmique des cellules musculaires lisses cardiaques. En effet, c'est le relargage du calcium contenu dans les sites de stockage intracellulaire qui modifie la concentration calcique dans le cytosol et qui induit l'entrée de calcium extracellulaire vers le milieu intracellulaire par de canaux calciques membranaires permettant le maintien d'une concentration élevée de calcium libre intracellulaire responsable du maintien de l'interaction actine-myosine et donc de la contraction.

2.5.2.2 Matrice extracellulaire

La matrice extra cellulaire est composée de fibres élastiques d'élastine, de collagène (type I et type III) et d'une substance fondamentale composée de protéoglycanes qui ont une grande affinité pour les lipoprotéines de faible densité qui forment alors des complexes insolubles. Les protéines constituant la matrice extracellulaire, les glycoprotéines, protéoglycanes et collagènes sont d'importants modulateurs de la croissance des cellules musculaires lisses de la média. L'adhérence entre les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire se fait via une famille de récepteurs appelés intégrines.

2.5.3 Adventice

L'adventice est composé de fibres de collagènes et de fibroblastes. Elle est traversée par le vasa vasorum, et des filets nerveux et lymphatiques. La vascularisation de la paroi des gros vaisseaux est assurée à la fois par le vasa vasorum adventiciel et par le flux sanguin endoluminal. L'imbibition à partir du flux sanguin endoluminal suffit pour les artères de petit calibre à paroi moins épaisses. La stimulation des cellules musculaires lisses de la média se fait via les récepteurs alpha (vasoconstriction) et bêta (vasodilatation) par action des fibres nerveuses sur les myocytes de la couche externe qui transmettent aux cellules sous-jacentes l'excitation à l'aide de seconds messagers.

2.6 Propriété des vaisseaux

2.6.1 Régulation locale du débit vasculaire d'un organe

Les cellules musculaires lisses de la média des artères sont responsables du tonus vasomoteur. Elles sont donc la cible des communications extracellulaires initiées soit par l'endothélium (dites centrifuges) soit par les terminaisons nerveuse adventitielles (dites centripètes) qui génèrent et modulent le niveau de contraction ou de relaxation des cellules musculaires lisses [62].

2.6.1.1 Vasoconstriction

La vasoconstriction des cellules musculaires lisses est essentiellement de type centripète. Ainsi les catécholamines et les peptides du système rénine-angiotensine-aldostérone sont libérés à la jonction neuromusculaire située à l'interface entre l'adventice et la média. De demi-vie courte, l'action de ces peptides est limitée dans l'espace et c'est grâce à l'organisation syncytiale des cellules musculaires lisses que les signaux intracellulaires générés se propagent d'une cellule à l'autre. Les mécanismes vasoconstricteurs sont soit diffus, et représentés par les catécholamines et le système rénine-angiotensine-aldostérone, soit locaux, essentiellement représentés par l'endothéline, le thromboxane A₂ et la prostaglandine H₂, les anions superoxydes et l'hypoxie.

Les catécholamines stimulent les récepteurs α 1-adrénergiques couplés à la voie des phosphoinositols au niveau des jonctions neuromusculaires adventitielles. Le système rénine-angiotensine fait intervenir la rénine sécrétée par l'appareil juxta-glomérulaire et l'angiotensinogène sécrété par le foie. La sécrétion de rénine est régulée par la pression sanguine de perfusion, la concentration sodique dans la macula densa du tube contourné distal du rein, la stimulation β -adrénergétique et le rétrocontrôle négatif de l'angiotensine II. La rénine clive l'angiotensinogène en angiotensine I qui est ensuite transformé en angiotensine II

par l'enzyme de conversion. L'angiotensine II stimule alors les récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT-1) des cellules musculaires lisses qui sont couplés à la voie des phosphoinositols qui modulent la contraction des cellules musculaires lisses via la libération de métabolites vasoactifs comme l'endothéline. Le récepteur AT-1 est en outre capable de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en induisant la transcription de facteurs de croissance comme le PDGF A (Platelet derived growth factor) ou le TGFβ1 (Transforming growth factor).

Localement, l'endothéline 1 couplée au récepteur de l'endothéline de type 1 induit une vasoconstriction via l'activation de la phospholipase C. La libération d'endothéline est inhibée par le NO et les contraintes de cisaillement élevées. L'étirement des cellules musculaires lisses stimule localement la sécrétion et la synthèse du thromboxane A2 et de la prostaglandine H2, aux effets vasoconstricteurs antagonistes. Enfin les anions superoxydes dégradent localement le NO et diminuent sa demi-vie et son action. Les situations qui génèrent la production de radicaux libres sont nombreuses, incluant l'hypercholestérolémie, l'ischémie/reperfusion, l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. Enfin l'hypoxie induit une dysfonction endothéliale en favorisant la synthèse d'endothéline-1 et en inhibant celle de la nitric oxyde synthase (NOS) de type III, endothéliale. A long terme, l'hypoxie induit un remodelage vasculaire positif en favorisant la prolifération cellulaire par la synthèse de facteurs de croissance PDGFβ, VEGF et le développement de la matrice extracellulaire par la synthèse de collagène IV.

2.6.1.2 Vasodilatation

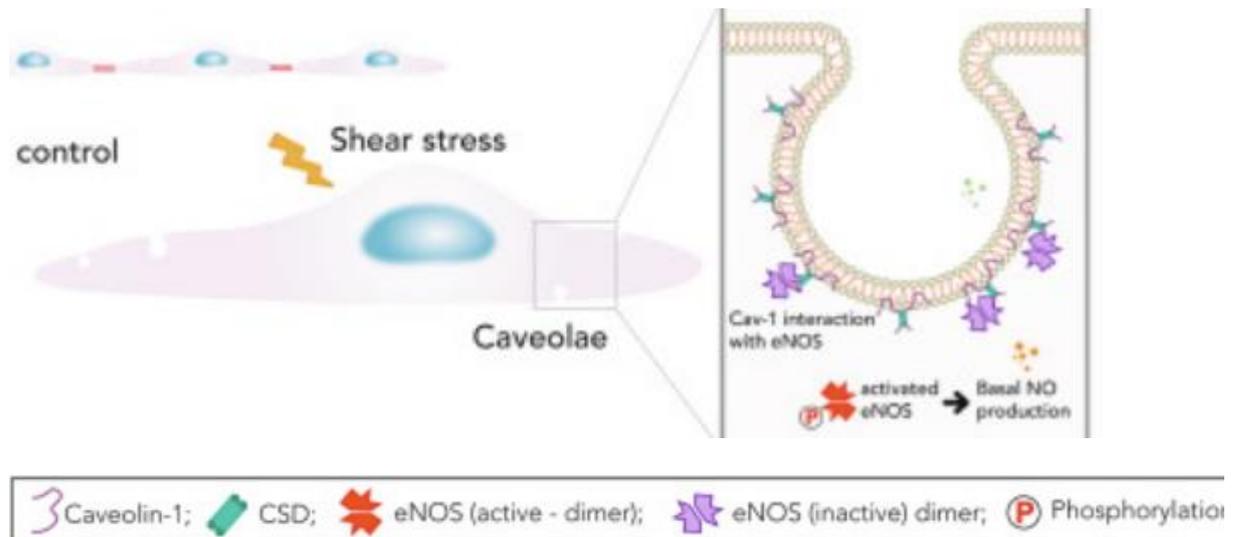
A l'opposé, les facteurs vasodilatateurs sont locaux. Les communications vasodilatatrices centrifuges, initiées par l'endothélium, sont prépondérantes dans les artères de conductance où elles modulent le diamètre artériel en fonction de l'activité métabolique d'aval. En revanche

dans les artérioles, ce sont les communications vasodilatatrices centripètes qui prédominent et qui modulent le diamètre artériolaire en fonction de l'activité métabolique environnante.

Les facteurs vasodilatateurs principaux sont le NO, les prostacyclines et l'endothélium derived hyperpolarizing factor (EDHF). Tandis que les prostacyclines et le NO sont prépondérants dans les artères de conductance, l'EDHF est essentiellement présent dans les artères de résistance en synergie avec le NO.

Le NO est un facteur important de la vasodilatation, il est particulièrement impliqué par les modifications des forces de cisaillement. Il est synthétisé dans les vaisseaux par l'action catalytique de la NOS de type III, endothéliale, sur la L-arginine, pour former du NO et de la L-citrulline [63]. La NOS de type III est calcium-calmoduline dépendante et est exprimée à la surface des membranes plasmiques des cellules endothéliales. La NOS de type III est associée à une structure membranaire appelée cavéole sensible aux variations de contraintes hémodynamiques (**Figure 12**). La NOS III va y être associée à la cavéoline qui l'inhibe ou à la calmoduline qui l'active. Sous l'effet de l'augmentation des contraintes de cisaillement endothélial la NOS III se dissocie de la cavéoline et s'associe à la calmoduline avec pour conséquence la production de NO [64]. Le NO va ensuite activer la guanylate cyclase présente dans la cellule musculaire lisse qui transforme la guanosine triphosphate en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La GMPc va ensuite activer les protéines kinases G de type I qui induisent la relaxation du muscle lisse [65]. Enfin le NO exerce un rétrocontrôle négatif sur la production des récepteurs AT-1 responsable de la vasoconstriction et de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Figure 12. Les cavéoles membranaires endothéliales.



Les prostacyclines sont des antiagrégants plaquettaires puissants et un vasodilatateur de demi-vie plus longue que celle du NO. Ubiquitaire, sa synthèse et sa libération sont stimulés par des agonistes et par les contraintes de cisaillement [66]. La production de prostacyclines est directement dépendante des contraintes de cisaillement et de leur pulsatilité [67].

Dans les artérioles, les communications centripètes prédominantes passent par les voies de l'adénylate monophosphate cyclique (AMPC). Quand l'activité métabolique des cellules musculaires périphériques augmente, la libération d'adénosine, de demi-vie brève induit ne vasodilatation locale des artérioles terminale. L'hyperhémie métabolique qui en résulte provoque une augmentation des vitesses de circulation sanguine locale et des contraintes e cisaillement à l'interface sang - paroi responsable d'une vasodilatation des artères de conductance du territoire concerné.

2.6.2 Interaction vasomotricité et vasotrophie

Il existe une interaction entre les effets vasoconstricteurs (hormonaux ou mécaniques) ou les effets vasodilatateurs, en particulier du NO et la trophicité des vaisseaux. En effet, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'angiotensine II augmente la synthèse protéique et favorise la multiplication cellulaire en favorisant l'expression de proto-oncogènes *c-fos* et *c-myc* et en augmentant la production de facteurs de croissance tels que le PDGF [68–70]. Cependant cet effet semble nécessiter une augmentation de la tension pariétale. En effet, il apparaît que des situations avec une forte stimulation de la sécrétion d'angiotensine II ne suffisent pas à modifier l'épaisseur vasculaire pariétale : dans le cas de la dépression sodée par exemple ou de la coarctation de l'aorte inter rénale. Dans ce dernier cas, malgré une puissante stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone, il n'est observé de modification de l'épaisseur pariétale aortique qu'en amont de la sténose. Il semble donc qu'il y ait nécessité d'une action synergique hormonale et mécanique afin d'obtenir une réponse vasotrophique proliférative. Des effets analogues à ceux observés avec l'angiotensine II ont été rapportés avec d'autres effecteurs vasoactifs : endothéline, stimulation alpha-sympathique, bradykinine [71, 72].

A l'opposé, il a été démontré que la sécrétion de NO inhibait la prolifération des cellules musculaires lisses et l'hyperplasie intimale [73–76]. Le NO via le GMPc induit une diminution de synthèse endothéliale de PDGF et d'endothéline ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1). Les variations des forces de cisaillement inhibent donc la prolifération intimo-médiale via les effets inhibiteurs du NO.

2.7 Remodelage vasculaire, interactions contraintes hémodynamiques / paroi artérielle

2.7.1 Géométrie du vaisseau : le rayon

Le rayon du vaisseau est considéré comme une grandeur qui entre dans la définition des contraintes hémodynamiques. En effet, le rayon du vaisseau intervient dans le calcul des forces de cisaillement et de tension pariétale. Ainsi, la contrainte de cisaillement τ est inversement proportionnelle au rayon r :

$$\tau = \frac{4\mu v}{r}$$

Alors que la tension pariétale est directement proportionnelle au rayon :

$$T = P \times r$$

En modifiant son rayon, le vaisseau est capable de réguler les contraintes hémodynamiques. Les variations de contraintes de cisaillement entraînent des variations du taux de calcium libre intracellulaire endothéliale, modifiant l'activité de la NOS, par conséquent la production de NO et la relaxation musculaire lisse sous-jacente [77]. Plus précisément, l'augmentation des forces de cisaillement active l'expression de l'ARN messager de la NOS et la production de NO par les cellules endothéliales. Le NO diffuse dans les cellules musculaires lisses sous-jacentes et active la guanylate cyclase soluble, avec pour conséquence une relaxation du vaisseau par augmentation du GMPc. Au contraire, une diminution des contraintes de cisaillement entraîne une diminution du calibre d'un vaisseau. Cette diminution de calibre passe par une diminution de l'expression de la NOS endothéliale et donc de la production de NO et de GMPc. Cette interaction dépend donc de la présence de

l'endothélium comme source de NO.

Parallèlement, l'augmentation ou la diminution du calibre entraîne une modification des tensions pariétales appliquées au vaisseau. L'augmentation des tensions pariétales a pour effet une stimulation des cellules musculaires lisses. Celles-ci vont alors modifier le tonus vasomoteur local et entraîner une modulation de leur patron d'expression génique qui va induire le remodelage vasculaire. Ainsi, la relaxation musculaire lisse associée au remodelage vasculaire local va aboutir à une normalisation des contraintes hémodynamiques de cisaillement à l'interface entre le sang et le vaisseau.

2.7.2 Interaction tension pariétale / remodelage vasculaire

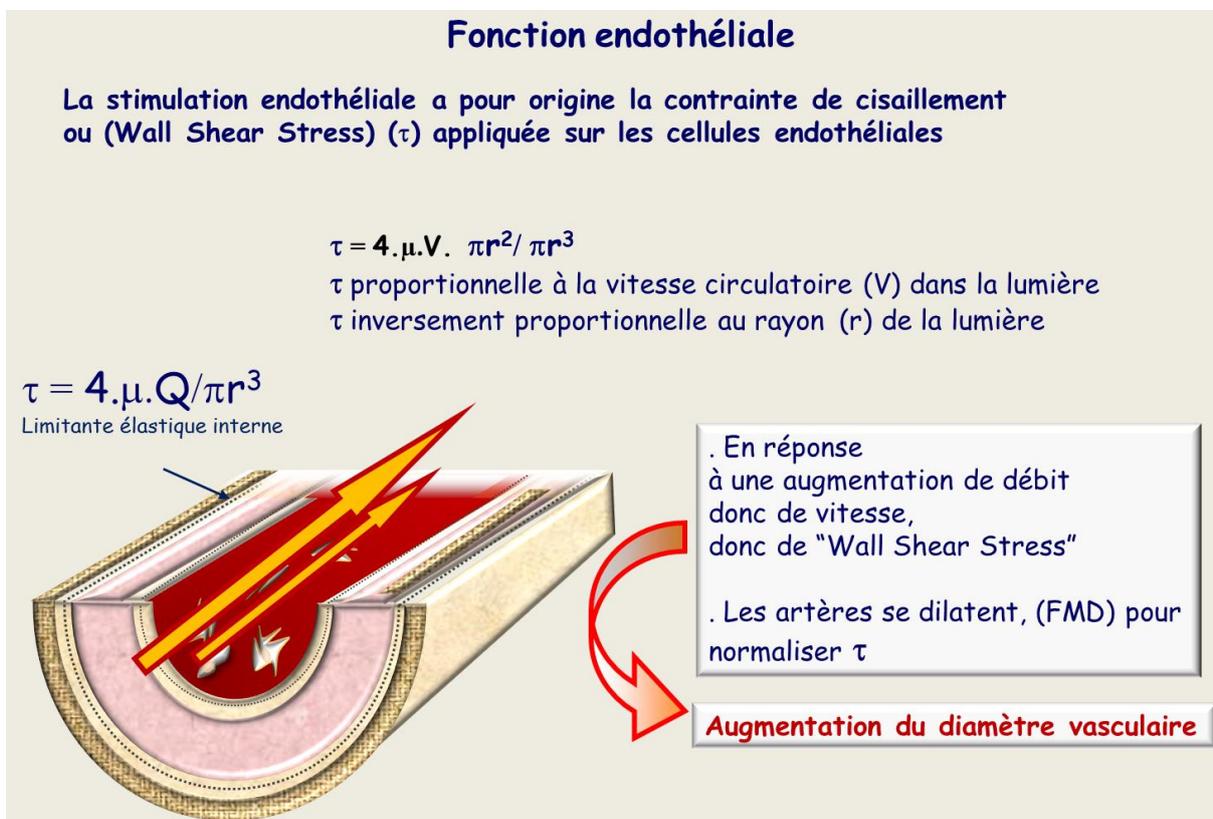
L'augmentation de la pression sanguine et/ou du diamètre vasculaire a pour conséquence une augmentation de la tension pariétale exercée essentiellement sur la média du vaisseau. La distension des fibres de collagènes de la matrice extracellulaire entraîne via les intégrines un étirement des cellules musculaires lisses et un épaississement du cytosquelette. Les intégrines sont des protéines ubiquitaires hétérodimériques qui sont responsables de l'adhésion du cytosquelette à la matrice extracellulaire. Les intégrines transmettent les signaux mécaniques au cytosquelette et entraînent une production de NO. Ce phénomène nommé mécanotransmission conduit à une hypertrophie concentrique de la paroi du vaisseau, soit par réarrangement des cellules musculaires lisses et de la matrice extracellulaire, soit par augmentation de la masse musculaire et du contenu en élastine et en collagène de la matrice [78–80]. À l'inverse, une diminution des tensions pariétales induit une diminution du contenu en collagène et une hypoplasie cellulaire [81].

2.7.3 Interaction force de cisaillement / remodelage vasculaire

Les variations du diamètre vasculaire induites par les contraintes de cisaillement sont

locales et ne concernent que le vaisseau où ces contraintes sont appliquées. Elles sont indépendantes de l'innervation artérielle et des changements de pression artérielle [82]. Le moteur principale de ces variations de diamètre est la cellule musculaire lisse qui seule, ne détecte pas les contraintes de cisaillements < 100 dynes/cm² [83]. C'est en fait l'endothélium qui répond aux variations de débit et de contraintes de cisaillement (**Figure 13**).

Figure 13. L'endothélium, effecteur principal des forces de cisaillement [59]



En effet, une artère désendothélialisée ne répond plus aux variations des forces de cisaillement [83]. Il a été mis en évidence que la diminution des contraintes de cisaillement endothéliales induisait un retard de croissance de l'artère associé à une réduction de diamètre, et une altération des propriétés élastiques par diminution de son contenu en élastine [84, 85]. Au contraire, une augmentation des contraintes de cisaillement induit l'augmentation de la

sécrétion de facteurs de croissance et une hypertrophie [86]. Les contraintes de cisaillement agissent directement sur la membrane plasmique endothéliale à l'interface sang/vaisseau par deux moyens.

Le premier est une stimulation d'un site primaire situé à l'origine de la transmission de seconds messagers biochimiques/électrophysiologiques.

Le second est la stimulation de différents sites reliés au cytosquelette. Ce phénomène est appelé mécanotransduction.

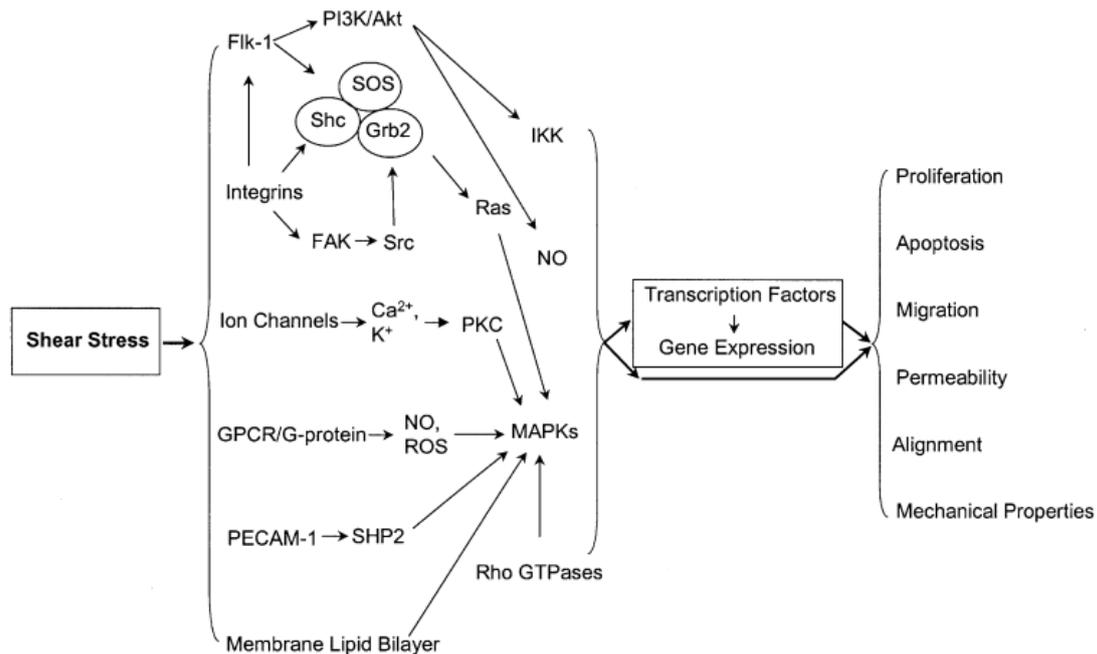
2.7.4 Mécanismes biomoléculaires sous-tendus

Les cellules endothéliales agissent comme une interface de détection pour la transduction des forces hydrodynamiques. Des études suggèrent que les intégrines, le récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Flk-1), les canaux ioniques, les récepteurs couplés aux protéines G, ainsi que des molécules d'adhérence telles que la molécule d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales des plaquettes participent à la détection de la contrainte de cisaillement par les cellules endothéliales. Plusieurs molécules sont impliquées dans la détection de la force mécanique appliquée à la surface membranaire des cellules endothéliales et suggèrent que leurs imbrications orchestrent l'initiation des réponses cellulaires (Figure 16).

Les contraintes de frictions tangentielles au débit sanguin vont étirer les cellules endothéliales et entraîner l'augmentation de la production de NO, via la transcription de l'ARN messager de la NOS de type III [87–89]. Il existe des canaux non sélectifs aux contraintes de cisaillement à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales dont l'activité est proportionnelle à l'intensité des contraintes de cisaillement, avec un maximum d'activité pour une valeur de 20 dyne/cm² [90]. Il s'agit de canaux potassique de type « inward rectifying K channels » qui entraînent une hyperpolarisation de la cellule

responsable d'un gradient électrochimique qui conduit une entrée de calcium par des canaux calciques voltages-dépendants [91]. Il a été démontré que la libération de NO était dépendante de ces canaux potassique calcium dépendants [92].

Figure 16. Réponses des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement [93].



Mécanosensibilité induite par la contrainte de cisaillement et la signalisation intracellulaire menant à la modulation de l'expression des gènes et des fonctions cellulaires

Plus spécifiquement dans les conditions de l'angiogenèse tumorale, les néovaisseaux tumoraux pathologiques sont caractérisés par un remodelage phénotypique leur conférant une spécification de type artérielle. Les marqueurs de spécificité artérielle tels que Notch-1, éphrine B2 ou neuropiline-1 sont retrouvés à la surface des cellules endothéliales tumorales. Certains suggèrent que des modifications de débit sanguin local et de pression interstitielle pourraient être à l'origine de cette expression phénotypique [94]. Il a été démontré dans un modèle d'embryogenèse que l'inversion du flux dans une membrane chorioallantoïdienne supprime l'expression de certains marqueurs de spécification artérielle.

De plus, il a été démontré dans un modèle de CHC génétique murin exprimant l'antigène T de SV 40 sous le contrôle du promoteur de l'antithrombine III que des marqueurs de spécificité artérielle tels que Notch-4 étaient surexprimés dans les sinusoides selon une cinétique superposable à la cancérogenèse [95]. Ainsi, les changements phénotypiques acquis au cours de l'angiogenèse seraient responsables de modifications hémodynamiques inductibles par la masse tumorale et donc du remodelage vasculaire.

2.8 Moyens d'études

Afin d'évaluer les forces de cisaillement et leur effet sur les artères il est nécessaire d'avoir accès au diamètre vasculaire et à la vitesse sanguine instantanée. Il existe essentiellement deux moyens d'imagerie non invasive permettant d'obtenir ces informations : l'échographie Doppler et l'IRM vélocimétrique par contraste de phase.

2.8.1 Echographie Doppler

L'échographie Doppler est une méthode d'imagerie non invasive utilisée en routine clinique basée sur l'utilisation des ultrasons. Développée initialement à des fins militaires lors de la seconde guerre mondiale pour la localisation des sous-marins, l'échographie s'est ensuite développée dans le milieu médical avec de nombreuses applications dans les domaines de l'obstétrique, de la physiologie cardio-vasculaire et de l'oncologie. L'échographie bidimensionnelle a été initialement décrite par Ian Donald en 1958 à partir de l'analyse des masses abdominales chez la femme [96]. Appliqué au système vasculaire, elle permet une analyse morphologique de la paroi des artères (artériosclérose, athérome, sténose, thrombose). Le principe est celui de l'émission d'une onde ultrasonore qui traverse des milieux de densité liquidienne puis qui réfléchit une partie de son énergie à chaque interface traversée. La réflexion de cette onde ultrasonore produit une onde de moindre puissance en sens inverse. Le délai entre l'émission de l'onde et sa réflexion ainsi que l'intensité de l'onde réfléchie permet d'extraire des informations sur la nature de l'interface réfléchissante et sa profondeur. Ces informations peuvent alors être traduites en niveaux de gris avec une information qualitative (nature de l'interface traversée) et localisatrice (profondeur de l'interface par rapport à la source émettrice).

L'échographie est ainsi, une modalité d'imagerie non vulnérante, c'est-à-dire sans utilisation de rayon ionisant ni injection de produit de contraste dans ses conditions habituelles d'utilisation. En outre, elle autorise une résolution spatiale élevée, grâce à l'utilisation de sondes permettant l'émission de hautes fréquences. Enfin, du fait de son caractère non irradiant, elle autorise l'application continue d'un faisceau ultrasonore sur une structure permettant d'étudier son évolution quasiment en temps réel. Cette dernière caractéristique a permis de développer l'échographie Doppler. Le Doppler étudie les données cinétiques issues d'un corps en mouvement. Découvert en août 1842 par Johann Christian

Doppler en observant les changements de couleur (longueur d'ondes) des étoiles lorsqu'elles s'approchent ou s'éloignent de la Terre. L'effet Doppler a été initialement décrit pour l'étude du mouvement des parois et des valves cardiaques en 1956 puis l'étude des flux sanguins en 1959 [97] par Shigeo Satomura. Les développements des deux méthodes combinées pour l'exploration vasculaire ont été considérables depuis les années 70 - 80. Le Doppler vasculaire permet une analyse hémodynamique des écoulements dans les artères, in situ, en regard des lésions, comme en aval, afin d'évaluer le retentissement régional. Le changement de fréquence d'une source d'ondes en déplacement relatif peut donc être enregistré et il est possible d'en déduire la vitesse de déplacement. Plus précisément, lorsqu'un faisceau d'ultrasons émis par une source rencontre une cible fixe, la fréquence réfléchie par cette cible est identique à la fréquence émise. Lorsque la cible se déplace, la fréquence réfléchie est différente de la fréquence émise. Cette différence (ΔF) entre la fréquence d'émission (F_e) et la fréquence de réception (F_r) s'appelle la fréquence doppler (**Figure 14**). Si les fréquences d'émission et de réflexion sont en MHz, la ΔF est kHz c'est-à-dire dans la gamme des sons audibles par l'oreille humaine ; il suffit donc de mettre en série un amplificateur audio pour entendre le son Doppler [98]. Ainsi, l'effet doppler permet de déceler le mouvement des hématies dans un vaisseau. La fréquence doppler ΔF s'exprime par la relation suivante :

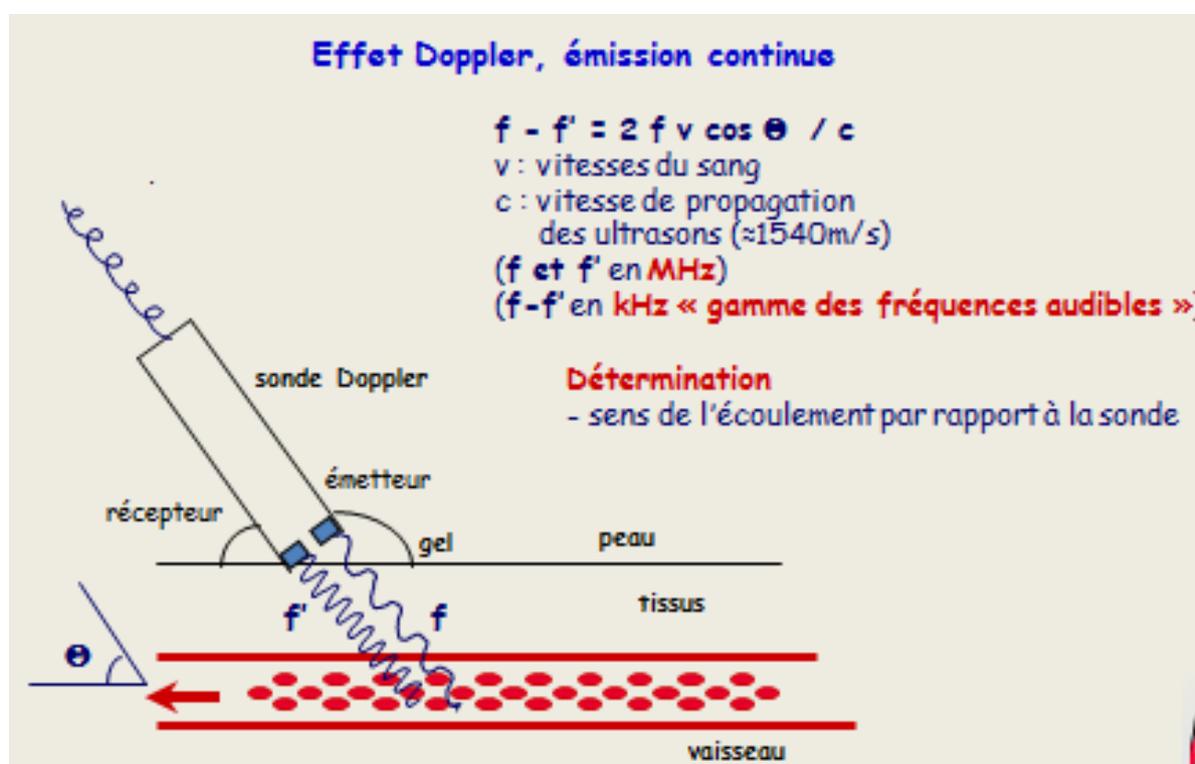
$$\Delta F = F_r - F_e = \frac{2 F_e V \cos\theta}{C}$$

- F_e : fréquence d'émission de la sonde, en Hz ;
- F_r : fréquence de réception de la sonde, en Hz ;
- V : vitesse des éléments figurés dans le vaisseau, en cm/s ;
- θ : angle entre l'axe du vaisseau et l'axe du faisceau ultrasonore ;

– C : vitesse moyenne des ultrasons dans le corps humain (1 540 m/s) ;

La fréquence d'émission est en général comprise entre 2 et 20 MHz. Le choix de la fréquence d'émission résulte d'un compromis entre l'atténuation de l'onde ultrasonore (fonction de la fréquence et de la profondeur de l'examen) et le pouvoir de rétrodiffusion des organes qui croît avec la fréquence (en fait selon f^4 , loi de Rayleigh).

Figure 14. Méthode d'échographie Doppler [59]



Le développement du Doppler pulsé a permis d'échantillonner spécifiquement une structure d'intérêt à une profondeur donnée. La possibilité de coupler le Doppler à l'échographie simultanément a permis de déterminer cette zone d'intérêt. Les progrès en termes de miniaturisation, de calcul et de mémoire de stockage immédiat ont ensuite permis d'obtenir quasi - instantanément l'information Doppler en tout point d'un champ d'exploration échographique grâce aux possibilités d'émission et de réception multiples des

ondes ultrasonores (système multiportes multilignes) ; une image des déplacements des éléments figurés du sang dans les vaisseaux, du signal doppler codé en couleur est ensuite superposée à l'image échographique bidimensionnelle. Les structures vasculaires ainsi visualisées à l'écran, il est possible d'apporter et d'ajuster au diamètre vasculaire circulant une fenêtre de Doppler pulsé pour enregistrer et analyser en temps réel rapidement l'analyse spectrale du signal pour ensuite mesurer un très grand nombre de paramètres circulatoires.

Pour analyser l'ensemble des vitesses circulatoires dans un vaisseau, on utilise l'analyse spectrale, qui exprime graphiquement la totalité des fréquences contenues dans le signal doppler. À l'ensemble des hématies d'une région d'intérêt correspond un ensemble de fréquences Doppler appelé spectre de fréquences. L'analyse du spectre en temps réel est possible par l'utilisation d'une Transformée de Fourier rapide.

2.8.2 IRM vélocimétrique par contraste de phase

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode d'imagerie non irradiante décrite initialement en 1946 et qui utilise une propriété caractéristique des éléments contenant un nombre impair de nucléons (protons et neutrons du noyau) chargé positivement. Ces éléments ont des propriétés magnétiques liées à la rotation sur elle-même de la particule (le spin). L'IRM étudie les modifications de l'aimantation des noyaux d'hydrogène d'une substance soumise à un champ magnétique statique fixe élevé (B_0 , en Tesla). En présence de ce champ magnétique, tous les atomes s'orientent selon le sens d'orientation de ce dernier et tournent sur leur axe avec une fréquence angulaire (ω , rad/s) :

$$\omega = \gamma B_0$$

Où γ est le rapport gyromagnétique propre à chaque noyau, en MHz/Tesla.

L'application d'une onde de radiofréquence à la fréquence de résonance du noyau ω permet un transfert d'énergie perturbant l'équilibre du système en désorientant les atomes. Le retour à l'équilibre d'un atome ainsi en rotation décrit une double précession qui confère une aimantation avec une composante double dite relaxation longitudinale et relaxation transversale : T1 et T2. Ces deux types de relaxation vont permettre d'extraire un signal électrique mesurable. Plus précisément, c'est l'espace fréquentiel du signal qui est recueilli et c'est grâce à une transformée de Fourier inverse que l'on pourra obtenir une image compréhensible par l'œil humain.

Les paramètres du T1 et du T2 vont être ajustés afin d'obtenir différents contrastes fonction de la concentration de proton, de la température, de la concentration en oxygène, ou du flux sanguin permettant une caractérisation tissulaire. Il existe différentes séquences IRM permettant d'obtenir des informations morphologiques, mais aussi fonctionnelles, c'est-à-dire

décrivant une fonction d'un tissu. Parmi les séquences d'imagerie fonctionnelle on peut citer : la diffusion, la perfusion, la spectroscopie, l'élastographie, l'IRM d'activation cérébrale ou encore l'angiographie par résonance magnétique.

L'angiographie par résonance magnétique peut se faire par deux méthodes :

1. Par injection d'un produit de contraste dont on suit l'évolution dans la circulation sanguine
2. Sans injection, en exploitant les phénomènes de flux à l'intérieur de chaque vaisseau.

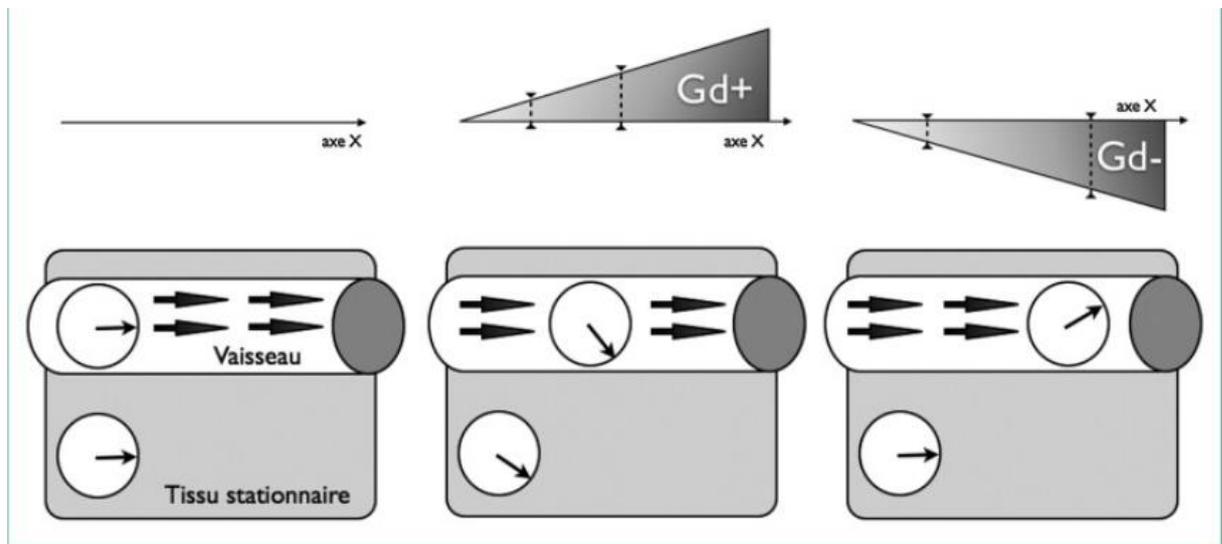
Ainsi, l'angiographie en contraste de phase repose sur le déphasage des spins mobiles en fonction de leur vitesse de déplacement le long d'un gradient magnétique linéaire bipolaire (**Figure 15**). Les images sont acquises avec un gradient d'encodage des vitesses choisi par l'utilisateur pour identifier la plage de vitesses dans laquelle les spins se déplacent. Lors de l'application du premier lobe du gradient (Gd+), les spins subissent un déphasage dépendant de leur position sur l'axe X [99]. Avec l'application du second gradient (Gd-), de même intensité et durée mais de polarité inversée, le déphasage des protons stationnaires est annulé alors que celui des protons en mouvement ($\Delta\phi$) devient proportionnel à leur vitesse de déplacement.

$$\Delta\phi = \gamma G V T^2$$

où

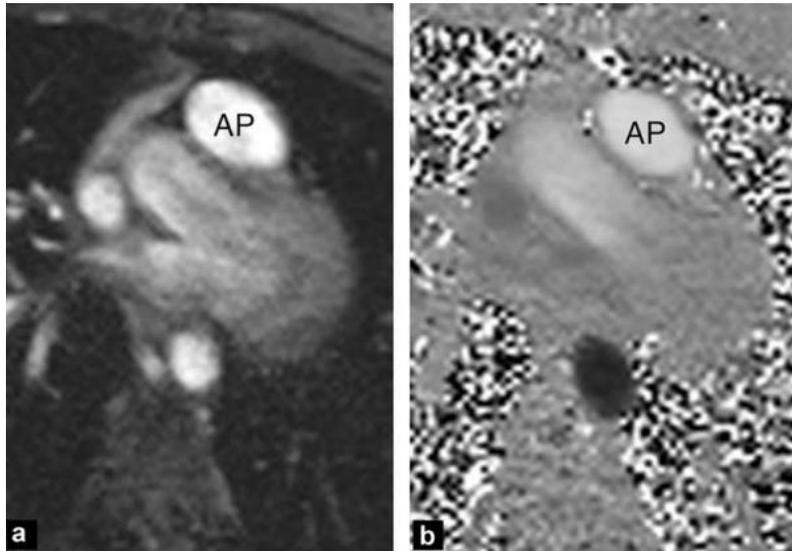
- γ correspond au rapport gyromagnétique, en MHz/Tesla
- G correspond à l'amplitude du gradient, en mTesla/m
- V correspond à la vitesse des protons en m/s
- T correspond au temps d'application d'un des gradients, en ms

Figure 15. Représentation schématique du principe de la vélocimétrie par contraste de phase en IRM [99]



La transformée de Fourier fournit 2 types d'informations : une information sur l'amplitude du signal (imagerie en magnitude) et une information sur la phase (imagerie en phase). L'imagerie en magnitude se traduit par une image morphologique (**Figure 16**). L'imagerie des flux en contraste de phase donne accès à la quantification des vitesses et des débits sanguins. Le plan d'acquisition doit être perpendiculaire au vaisseau d'intérêt. Les flux se dirigeant vers l'examineur sont codés en noir, ceux s'en éloignant en blanc.

Figure 16. IRM en contraste de phase dans l'artère pulmonaire (AP) avec quantification des flux [99].



(a) image en magnitude, anatomique en coupe oblique dans le plan de l'AP ; (b) image en contraste de phase.

Les limites de cette technique concernent les flux complexes ou turbulents à l'origine de déphasages intra-voxels et d'une perte de signal au niveau de boucles vasculaires, de bifurcations ou de sténoses. Il est nécessaire de réaliser une synchronisation cardiaque simultanée lors de ces séquences, soit à l'aide d'un électrocardiogramme soit d'un oxymètre de pouls. En effet la durée d'acquisition des séquences est supérieure à la durée de la systole cardiaque. L'IRM synchronisée avec le rythme cardiaque permet donc de s'assurer que chaque partie de l'image est enregistrée au même moment du cycle cardiaque [99]. Une autre difficulté de l'IRM en contraste de phase est de s'affranchir des mouvements respiratoires du patient qui peuvent perturber la quantification des flux. Il est donc nécessaire de contrôler le mouvement respiratoire du patient soit à l'aide d'une ceinture pneumatique soit à l'aide d'un contrôle au niveau du diaphragme qui va détecter la différence de contraste entre le foie et l'air des poumons afin de synchroniser la séquence à la respiration du patient. Enfin, pour la précision des mesures, l'acquisition doit être réalisée dans un plan perpendiculaire à l'axe du flux.

Cette imagerie de quantification des flux a été appliquée aux valves cardiaques, aux vaisseaux cérébraux, au tronc porte et aux artères hépatiques, et au flux de liquide céphalo-rachidien intracrânien [100–105].

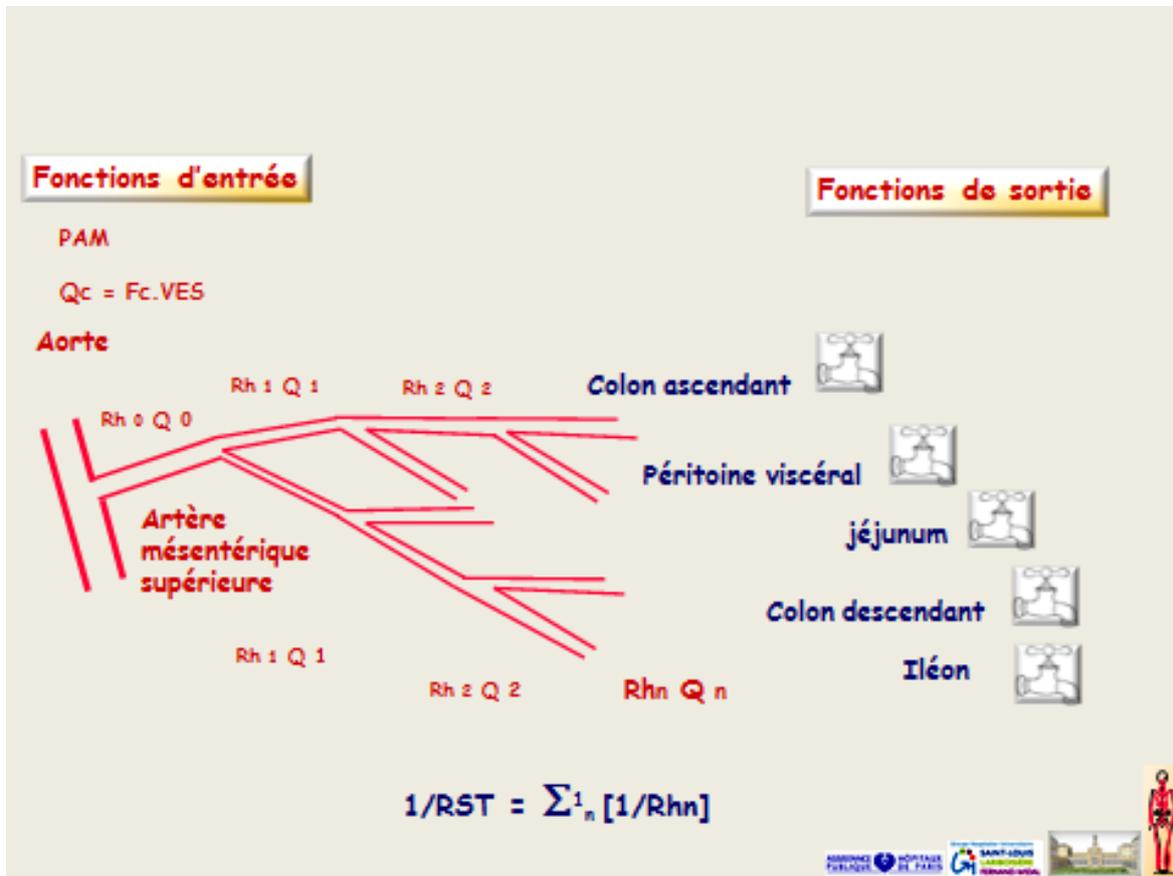
2.9 Hypothèse de travail

Un besoin de critères fonctionnels d'évaluation et de suivi de l'activité angiogénique tumorale apparaît pour différents modèles de néoangiogenèse tumorale et non tumorale. Ces critères fonctionnels d'évaluation et de suivi doivent aller au-delà des critères morphologiques et qualitatifs de rehaussement en imagerie en coupe afin de renseigner sur la dynamique d'évolutivité d'une lésion néoplasique.

La relation qui lie le débit sanguin local à la pression de perfusion et la résistance hémodynamique locale s'applique dans tous les vaisseaux de l'organisme. L'artère considérée se divise en artères de calibre de plus en plus petit mais la surface cumulée de section du système augmente modérément. Comme le système artériel est très peu résistif, la pression de perfusion reste la pression artérielle jusqu'au niveau artériolaire. A chaque division correspond une partition du débit dans les différentes branches collatérales et la résistance hémodynamique artériolaire s'exerce de toute façon à la distalité du système (**Figure 17**).

$$1/Q_t R_t = \sum_{k=0}^n [1/Q R_h n]$$

Figure 17. La pression de perfusion (ΔP) des organes est identique dans un système à haute pression [59].



Le débit sanguin se partage et les pertes de charges sont égales

La néo angiogénèse consiste en la création *de novo* d'un arbre vasculaire à partir de vaisseaux préexistants. Cet arbre vasculaire néoformé possède des caractéristiques propres qui diffèrent du réseau micro vasculaire physiologique par l'existence de communications artériolo-veinulaire directes et d'une perméabilité endothéliale accrue. Ces caractéristiques concourent à la diminution de la résistance périphérique à l'écoulement sanguin (Rh) de l'arbre vasculaire de l'organe où s'est greffé le réseau néoformé. En effet, conformément à la loi de Poiseuille, la résistance hydraulique dépend de la longueur du vaisseau (L) qui est constante, de la viscosité du sang, et du diamètre (R) du réseau capillaire considéré. Donc si le

diamètre global du lit vasculaire augmente, les résistances périphériques chutent de manière importante.

$$Rh = \frac{8 \eta L}{\pi R^4}$$

Afin de maintenir le débit de perfusion de l'organe « hôte » pour permettre d'assurer son fonctionnement normal et d'assurer la vascularisation du tissu tumoral, il est nécessaire d'augmenter le débit sanguin dans l'artère afférente d'amont (Q) alors que la pression de perfusion reste plus ou moins constante (P).

$$P = Q \cdot Rh$$

→ ↑ ↓

Or, cette augmentation du débit dans une canalisation dont le diamètre initial (S) reste identique en l'absence de remodelage artériel immédiat passe nécessairement par une augmentation des vitesses circulatoires (V).

$$Q1 = S1 \cdot V1$$

↑ → ↑

L'augmentation des vitesses circulatoires majore les forces de cisaillement à l'interface sang/endothélium. Cette augmentation s'accompagne d'une stimulation de la voie du NO endothéliale avec phénomènes de relaxation des cellules musculaires lisses de la média

associés à des phénomènes prolifératifs qui aboutissent à une vasodilatation ou remodelage artériel abouti. Cette vasodilatation aurait pour conséquence une augmentation de la tension pariétale qui est responsable d'un réarrangement des cellules musculaires lisses et de leur prolifération concourant à une augmentation de l'épaisseur du vaisseau pour rétablir la contrainte circonférentielle. Enfin cette augmentation de calibre vasculaire a pour objectif une normalisation des forces de cisaillement par normalisation de la vitesse d'écoulement sanguine.

$$Q^2 = S^2 \cdot V^2$$

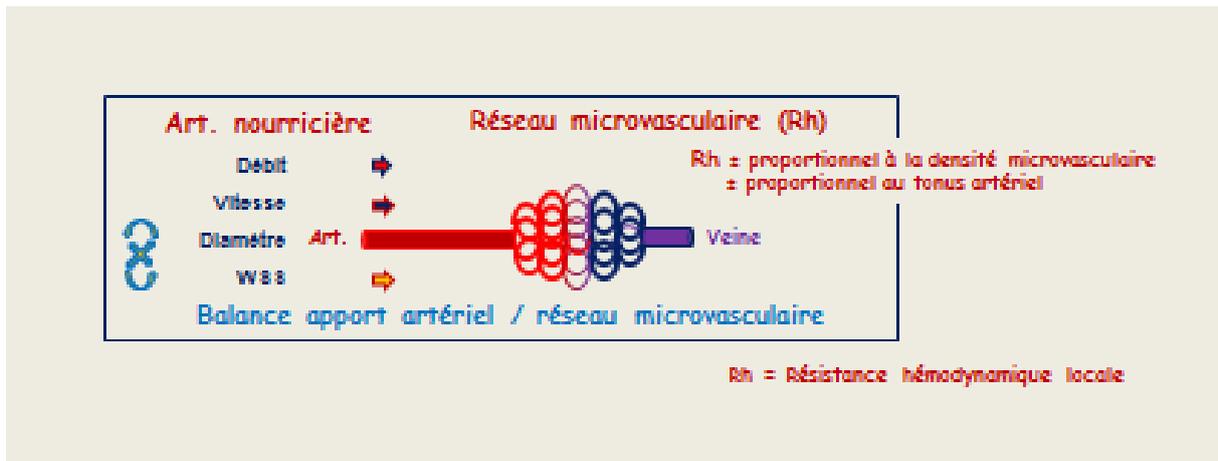
→ ↑ ↓

Le débit de l'organe « hôte » s'est donc adapté à l'apparition de cette greffe tumorale, c'est-à-dire a augmenté. Cette augmentation a été rendue possible après l'augmentation transitoire pendant plusieurs semaines des vitesses circulatoires, aboutissant à un remodelage artériel abouti.

L'hypothèse de travail est donc qu'il existe une adaptation hémodynamique à l'augmentation des besoins métaboliques d'un organe générée par une greffe tumorale. Plus précisément, lorsque le réseau vasculaire néoformé est en cours d'expansion, les vitesses circulatoires et les forces de cisaillement sont augmentées dans le vaisseau nourricier afin d'augmenter le débit sanguin, tandis que le calibre du vaisseau est en cours d'adaptation. Le diamètre du vaisseau augmente avec un certain retard par rapport à l'expansion vasculaire jusqu'à un état d'équilibre (remodelage expansif). Lorsque le réseau vasculaire néoformé est stable, quiescent ou contrôlé, le calibre du vaisseau est adapté, le débit se stabilise et les vitesses circulatoires (donc les forces de cisaillement appliquées à l'endothélium) sont normalisées (diminuées). Enfin, lorsque le réseau vasculaire involue, le débit sanguin diminue

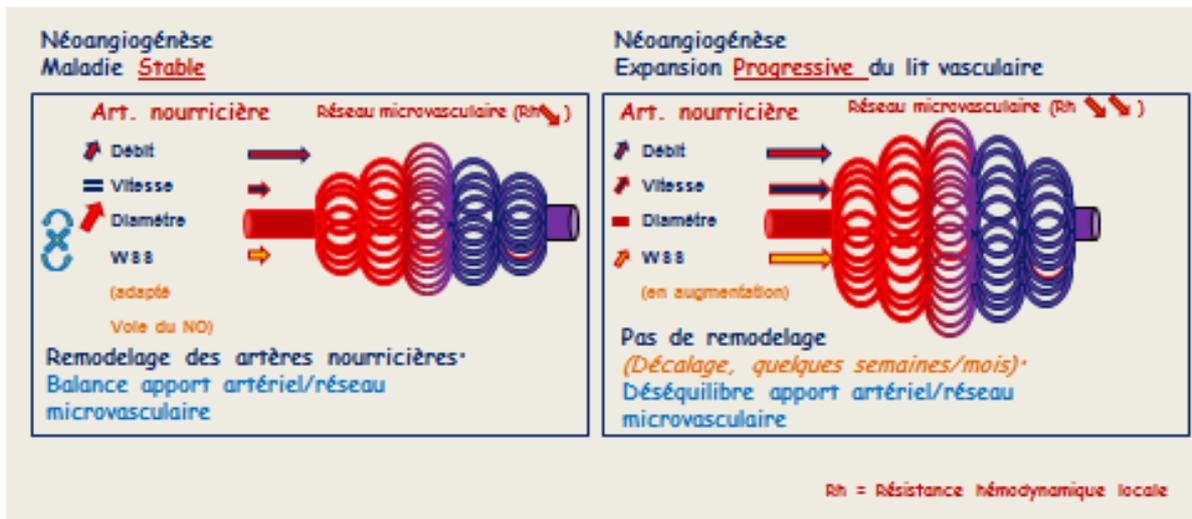
entraînant la diminution des vitesses circulatoires et des forces de cisaillement. Le calibre du vaisseau s'adapte avec un certain retard et diminue pour un retour à la normal du débit sanguin, des vitesses et du calibre artériel (remodelage régressif) (**Figures 18 & 19**).

Figure 18. Arbre vasculaire normal [59].



Artère afférente alimentant un réseau capillaire avec une résistance hydraulique (Rh) puis une veine unique de drainage.

Figure 19. Néoangiogenèse stable et progressive [59].



Dans une maladie stable le diamètre artériel est adapté à la chute des résistances imposées par l'expansion du lit vasculaire. Les vitesses et les contraintes de cisaillement sont normalisées et le débit est augmenté. Dans une maladie progressive, l'artère n'a pas eu le temps de s'adapter, les vitesses, les débits et les contraintes de cisaillement sont augmentés.

Au total, le niveau du débit sanguin dans l'artère afférente d'amont serait le reflet du « volume » du réseau micro vasculaire néoformé. Les forces de cisaillement et les vitesses sanguines mesurées dans le vaisseau afférent seraient le reflet du déphasage de la dynamique de survenue des événements à l'étage de l'artère afférente et à l'étage du lit micro vasculaire avec trois états possibles : expansion, stabilité ou régression. Le calibre du vaisseau nourricier afférent serait alors la variable d'ajustement qui va permettre au vaisseau d'adapter les vitesses circulatoires à son débit tout en normalisant les forces de cisaillement.

Dans les modèles murins, les moyens d'étude actuels de la circulation sanguine sont limités par la taille des vaisseaux dont les diamètres ne sont pas mesurables de manière assez précise et reproductible. Mais, dans ces modèles on a accès à la vitesse circulatoire qui est aussi le reflet de l'expansion par l'augmentation de débit sanguin local. Tandis que chez l'homme on a accès au diamètre du vaisseau et aux vitesses circulatoires donc au débit et aux forces de cisaillement qui s'y appliquent.

L'objectif de ce travail était donc de vérifier cette hypothèse dans différents types de réseaux vasculaires néoformés : dans un modèle de tumeur hépatique primitive d'origine génétique chez la souris, dans un modèle greffe tumorale de pseudomyxome péritonéal chez l'homme et de cancer de l'ovaire chez la souris et chez la femme et enfin dans un modèle de malformation artérioveineuse superficielle de la face chez l'homme.

3. PARTIE 2 : CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Applications dans le Diagnostic et Suivi de 4 pathologies tumorales

3.1 Carcinome hépatocellulaire chez la souris

Barral M, Raballand A, Dohan A, Soyer P, Pocard M, Bonnin P. Preclinical Assessment of the Efficacy of Antiangiogenic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Ultrasound Med Biol* 2016;42 :438-446.

3.1.1 Introduction

De nouvelles thérapies ciblées, en particulier des thérapies antiangiogéniques, peuvent désormais être utilisées pour offrir un traitement plus efficace sur le carcinome hépatocellulaire [106]. Mais la nécessité d'une quantification de l'angiogenèse devient primordiale avec le développement de nouveaux outils permettant de surveiller la réponse aux nouveaux médicaments antiangiogéniques [107]. Cependant, le rôle du traitement antiangiogénique dans le traitement du CHC est actuellement limité aux maladies au stade avancé [108, 109]. L'option thérapeutique de première ligne pour les patients inéligible à un traitement radical de résection tumorale (à savoir, altération de l'état général, invasion vasculaire ou extension extra-hépatique) consiste en l'administration orale d'une chimiothérapie, le sorafenib. Le sorafenib est un inhibiteur multikinase qui possède des propriétés antiprolifératives et antiangiogéniques et dont l'administration chez les patients atteints de CHC avec une cirrhose compensée permet une augmentation de 37% de la survie globale (équivalent à un gain de 2 à 3 mois de vie) [110]. Cependant, ce traitement est coûteux et a des effets secondaires importants puisque 30% des patients doivent arrêter leur traitement [110]. La sélection du patient répondeur est donc un enjeu majeur pour améliorer les performances du traitement et éviter les effets secondaires inutiles chez les patients qui ne bénéficieront pas du traitement [111].

Concernant la surveillance du CHC, l'imagerie non invasive telle que l'IRM avec injection multiphasique de chélate de gadolinium et la TDM sont désormais considérés comme un standard de référence dans l'évaluation de la tumeur et de la réponse aux traitements antiangiogéniques [112–117]. En effet, l'évaluation de la réponse tumorale à la chimiothérapie systémique en oncologie est actuellement basée sur les critères RECIST 1.1 [35]. Les critères RECIST 1.1 incluent uniquement des critères morphologiques (nombre et taille des lésions) et ne prennent pas en compte les modifications vasculaires induites par de nouvelles thérapies ciblées telles que les traitements antiangiogéniques [118]. Plus récemment, les nouveaux critères RECIST-modifiés et EASL (Association européenne pour l'étude du foie) incluent les modifications de la prise de contraste au cours de la phase artérielle [119, 120]. Par conséquent, pour évaluer le bénéfice clinique potentiel des nouveaux traitements, des outils d'imagerie fiables et robustes doivent d'abord être testés lors d'études précliniques utilisant différents modèles animaux.

Nous avons étudié l'activité antiangiogénique et anti-tumorale de certaines molécules utilisées dans le traitement du CHC humain sur un modèle murin de CHC, qui présente une forte croissance tumorale et un potentiel angiogénique élevé [121–123]. Dans ce modèle, c'est tout le foie qui est l'objet d'une transformation maligne, pas seulement quelques parties ou nodules tumoraux comme chez l'homme. Nous avons précédemment déterminé la croissance tumorale et le potentiel angiogénique élevé de la tumeur du foie développée dans ce modèle en utilisant à plusieurs reprises une échographie Doppler. Il a ensuite été prouvé dans ce modèle que les mesures du volume hépatique et des vitesses sanguines dans l'artère hépatique moyennée dans le temps et dans l'espace, fournissaient un moyen utile, reproductible, et non invasif de suivi de la croissance tumorale et de la néoangiogenèse [121, 122, 124].

Le but de la présente étude était donc double :

1. Premièrement, évaluer le potentiel de l'échographie Doppler à quantifier et à surveiller la néovascularisation tumorale dans le modèle murin de CHC.
2. Deuxièmement, établir un protocole fiable et reproductible pour surveiller la réponse tumorale à un traitement antiangiogénique, consécutive à l'administration de deux traitements : le bevacizumab et le sorafenib.

3.1.2 Résultat et conclusion

Dans cette étude, nous avons constaté que le volume du foie mesuré par échographie et les vitesses moyennes dans l'artère hépatique augmentaient de manière significative et suivaient la progression du stade de la maladie. En ce qui concerne les effets des traitements antiangiogéniques chez les souris ASV-B transgéniques, nous avons constaté que le sorafenib était supérieur au bevacizumab pour ralentir l'angiogenèse et la progression du volume du foie. Dans ce modèle de CHC murin, le bevacizumab n'a démontré aucune efficacité. Ces résultats reflètent ceux observés dans les essais cliniques dans lesquels le sorafenib est préféré au bevacizumab dans le traitement du CHC avancé [120, 125]. De plus, il a été démontré que la progression tumorale des souris ASV-B était principalement sous la gouvernance du PlGF et que la contribution du VEGF était négligeable [116]. Le sorafenib est un inhibiteur de multikinase ayant des effets antiprolifératifs et antiangiogéniques. Ces effets semblent prédominants chez les souris ASV-B, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de cette molécule sur la diminution du volume du foie et sur les vitesses sanguines moyennes dans l'artère hépatique et le tronc cœliaque.

Les résultats de notre étude suggèrent que la mesure des vitesses sanguines moyennes mesurées dans le tronc cœliaque par échographie Doppler et la mesure du volume du foie pourraient être considérées comme des outils précieux pour surveiller la progression tumorale et l'angiogenèse au cours d'essai préclinique et pour évaluer les effets de nouveaux médicaments antiangiogéniques. Le protocole d'évaluation des effets antiangiogéniques et

anti-tumoraux utilisant la souris transgéniques ASV-B et l'échographie Doppler séquentielle au cours de la croissance tumorale est maintenant utilisé dans le laboratoire pour faire la preuve de l'efficacité de nouveaux candidats-médicaments en phase préclinique.

● *Original Contribution*

PRECLINICAL ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF ANTI-ANGIOGENIC THERAPIES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

MATTHIAS BARRAL,^{*†} ANNEMILAI RABALLAND,[‡] ANTHONY DOHAN,^{*†} PHILIPPE SOYER,[†]
MARC POCARD,^{*§} and PHILIPPE BONNIN^{*¶}

^{*}Paris-Diderot University, Sorbonne Paris Cite, Lariboisiere Hospital, INSERM U965, Paris, France; [†]Service of Visceral and Vascular Radiology, APHP, Lariboisiere Hospital, Paris-Diderot University, Sorbonne Paris Cite, AP-HP, Paris, France; [‡]Paris-Diderot University, Sorbonne Paris Cite, AP-HP, Beaujon Hospital, INSERM U728, Clichy, France; [§]Service of Digestive and Cancer Surgery, APHP, Lariboisiere Hospital, Paris-Diderot University, Sorbonne Paris Cite, AP-HP, Paris, France; and [¶]Service of Clinical Physiology— Functional Investigations, APHP, Lariboisiere Hospital, Paris-Diderot University, Sorbonne Paris Cite, AP-HP, Paris, France

(Received 19 June 2015; revised 11 September 2015; in final form 18 October 2015)

Abstract—Diffuse hepatocellular carcinoma (HCC) is a complex affliction in which comorbidities can bias global outcome of cancer therapy. Better methods are thus warranted to directly assess effects of therapy on tumor angiogenesis and growth. As tumor angiogenesis is invariably associated with changes in local blood flow, we assessed the utility of ultrasound imaging in evaluation of the efficacy of anti-angiogenic therapy in a spontaneous transgenic mouse model of HCC. Blood flow velocities were measured monthly in the celiac trunk before and after administration of sorafenib or bevacizumab at doses corresponding to those currently used in clinical practice. Concordant with clinical experience, sorafenib, but not bevacizumab, reduced microvascular density and suppressed tumor growth relative to controls. Evolution of blood flow velocities correlated with microvascular density and with the evolution of tumor size. Ultrasound imaging thus provides a useful non-invasive tool for pre-clinical evaluation of new anti-angiogenic therapies for HCC. (E-mail: philippe.bonnin@aphp.fr) © 2016 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Murine model, Duplex Doppler ultrasound imaging, Anti-angiogenic drugs.

INTRODUCTION

Liver cancer has traditionally been treated by surgery or interventional locoregional ablative treatments, or, if these options were not feasible, by best supportive care (Al-Husein et al. 2012; El-Serag 2011; Fomer et al. 2012). Since 2008, systemic therapy with the multikinase inhibitor sorafenib has become available worldwide and has become the standard of care for patients with hepatocellular carcinoma (HCC) that is unresectable or beyond the reach of ablatherapy. Sorafenib increases the median overall survival time of these individuals by approximately 3 mo (Al-Husein et al. 2012; El-Serag 2011; Fomer et al. 2012). Despite this significant advance in the non-surgical/non-interventional management of HCC, it is only a first step

toward more powerful, targeted and better-tolerated oral anti-tumor treatments. Since the introduction of sorafenib into clinical practice, attempts made to develop more effective first-line treatments as well as an effective second-line treatment for HCC have not succeeded (Peck-Radosavljevic 2014). The development of drug treatments for HCC has been hampered in part by a push to establish the diagnosis of HCC by non-invasive imaging alone, without the requirement of liver biopsy for histologic confirmation, and in part because death is frequently caused by indirect complications rather than by the tumor itself (Peck-Radosavljevic 2014).

Anti-angiogenic drugs now offer a treatment option for a wide range of malignant tumors including HCC (Al-Husein et al. 2012; El-Serag 2011; Fomer et al. 2012). However, before new therapies are introduced in humans, their efficacy must be tested *in vivo* in preclinical studies. Accordingly, new tools are needed to monitor response to therapy and quantify tumor angiogenesis to evaluate new potential therapeutic targets in preclinical models (Griffin 2001; Sessa et al. 2008).

Address correspondence to: Philippe Bonnin, Service de Physiologie Clinique—Explorations-Fonctionnelles, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75010, Paris, France. E-mail: philippe.bonnin@aphp.fr

Tissue-specific expression of SV40 large T antigen in murine liver (anti-thrombin III-SV40 T [ASV-B]) triggers spontaneous and extensive growth of highly angiogenic HCC (Dubois *et al.* 1991). This model offers the possibility to follow both progression and response to treatment of HCC in the same animal, limiting the number of animals required in each experimental group. Two-dimensional (B-mode), color-coded and pulsed duplex Doppler ultrasound (US) measurements of liver volume and mean blood flow velocities (mBFVs) in the hepatic tumor-feeder artery have been used successfully to monitor tumor growth and angiogenesis in ASV-B mice (Bergé *et al.* 2010; Bonnin *et al.* 2007; Vincent *et al.* 2009).

Sorafenib has been reported to significantly decrease tumor perfusion and improve overall survival and is the main currently approved anti-angiogenic drug used for the treatment of HCC (Cheng *et al.* 2009; Fang *et al.* 2012; Frenette 2012; Llovet *et al.* 2008). Bevacizumab has also been evaluated for the treatment of HCC with a relatively lower rate of tumor response (Fang *et al.* 2012; Frenette 2012). The goal of the present study was to validate the use of ultrasound imaging (USI) to monitor tumor growth and angiogenesis in the ASV-B model of HCC treated with sorafenib or bevacizumab.

METHODS

Our study was approved by the ethics committee for experimentation on animals at our institution (Study C75-10-03). All animal experiments were performed under general anesthesia according to French laws regarding the treatment of experimental animals (Veterinary Health and Animal Production, Ministry of Agriculture).

Transgenic mouse model

This study was performed with ASV-B transgenic male mice, which spontaneously and systematically develop well-differentiated HCC affecting the entire liver. Hepatic targeting of the SV40 large T antigen is obtained with a 700-base pair regulatory sequence from the anti-thrombin III gene. As the transgene is inserted on the Y chromosome, only males present with HCC lesions (at 100% penetrance) (Dubois *et al.* 1991). Non-transgenic female littermates were matched for age and used as controls. In this model, the development of HCC is systematically characterized by four chronologic stages: (i) hyperplastic stage (4–12 wk) (Fig. 1a), (ii) nodular stage (at 16 wk) (Fig. 1b), (iii) multiple and macronodular (Fig. 1c) stage and (iv) diffuse well-differentiated HCC stage (after 20 wk) (Fig. 1d). Animals were sacrificed at 20 wk in compliance with the ethics committee guidelines of our institution. Livers were thus obtained at the beginning of the diffuse stage of the disease for

immunofluorescence analysis. Liver sections were prepared from all mice for all experiments.

Imaging protocol

Thirty ASV-B males and 10 ASV-B females underwent US examination at 8 wk of age (Siemens Acuson S3000, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) including measurement of the echo-derived liver volume using B-mode and measurement of mBFV in the celiac trunk and superior mesenteric artery using Doppler US. Echo-derived liver volume reflects tumor growth as the oncogene was expressed in all hepatocytes, resulting in HCC transformation of the entire liver. The mBFV in the celiac trunk allowed monitoring of tumor angiogenesis, as previously described (Bonnin *et al.* 2007). The 40 mice were then assigned to four groups of 10 mice as follows: ASV-B untreated males, ASV-B males treated with bevacizumab, ASV-B males treated with sorafenib and ASV-B female littermates that served as control patients.

Drugs were administered to the treatment groups from 8 wk of age (*i.e.*, hyperplastic phase), and US examinations were repeated monthly by the same operator until 20 wk of age in all experimental groups. Bevacizumab (5 mg/kg, Avastin, Roche, Basel, Switzerland) was injected intraperitoneally twice a week. Sorafenib (60 mg/kg, Nexavar, Bayer Schering Pharma, Bergkamen, Germany) was administered *per os* daily by gavage. The mice were weighed before each drug administration to adapt the treatment dose.

A 14-MHz probe (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) was used for B-mode US including all liver diameter measurements. Color Doppler mode (7.5 MHz) was activated on an anterior longitudinal view of the abdomen crossing the longitudinal axis of the aorta. The celiac trunk and mesenteric arteries were then drawn and localized on the screen by their color-coded blood flow. Spectral analyses of the Doppler signal recorded in the celiac trunk and superior mesenteric artery were successively acquired using a 7.5-MHz pulsed Doppler ultrasound frequency. The sample volume was set at 1 mm³, and the low-velocity rejection at 0.6 cm/s. The minimum detectable velocity was about 1 cm/s, and the maximum was 120 cm/s.

Mice were anesthetized (2.5% isoflurane in ambient air) and their abdomens and flanks were shaved. US examinations were performed with the mouse in the left lateral position to expose the liver. This position allowed the probe to be placed on its side edge to prevent excessive pressure on the abdomen of the animal. US examinations were carried out on a heating mat maintained at 40°C to minimize hypothermia (Hoit *et al.* 2002).

B-Mode, color-coded and pulsed Doppler US study

As previously described (Bonnin *et al.* 2007), liver volume was measured after setting the imaging depth at

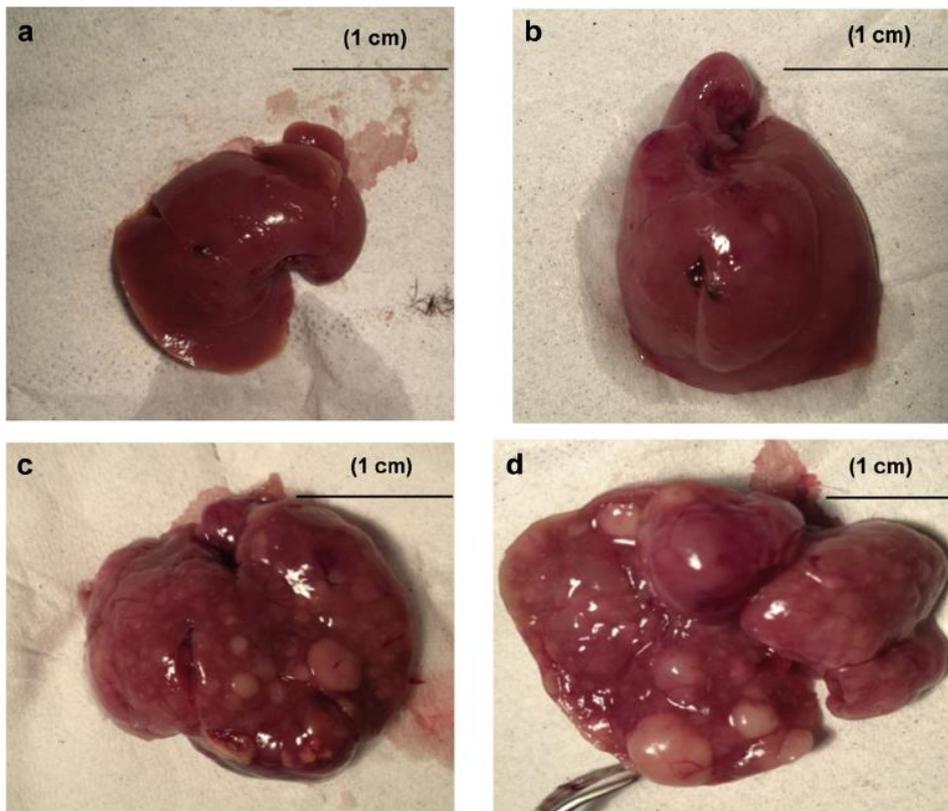


Fig. 1. Macroscopic views of the three different stages of tumor progression in the ASV-B mouse model of hepatocarcinoma (HCC). (a) Macroscopic view at 8 wk of a ASV-B hyperplastic liver. (b) A hyperplastic liver at 12 wk. (c) Multiple macronodular stage at 16 wk, (d) Well-differentiated diffuse HCC at 20 wk.

2 or 3 cm depending on the enhancement of liver size; the frame rate was 60 frames/s. The liver was first measured in three planes: transverse diameter (D_t), anteroposterior (D_a) diameters and height (H). For each animal and at each time point of the protocol, the largest obtainable diameters and height were retained (Fig. 2a–d). Echo-derived liver volume was then calculated with the formula

$$\text{Liver volume} = [\pi(D_t \cdot D_a)/4] \cdot H \quad (1)$$

Color Doppler mode was then activated to identify the celiac trunk and superior mesenteric artery. Pulsed Doppler US was activated, and the pulsed Doppler sample was placed on the longitudinal axis of each artery where it emerges from the abdominal aorta. The Doppler sample was consistently placed on each artery at a distance of 0.5 cm from the aorta. The spatial flow profile was recorded for Doppler velocity waveform recordings over 2 s (Fig. 2e, f). Peak systolic, end-diastolic and spatial-averaged-time-averaged mBFVs were measured after correcting the angle between the longitudinal axis of each vessel and the Doppler US beam. Because of the

anatomic orientation of both the celiac trunk and mesenteric artery in the abdominal cavity and of the position of the probe on the anterior wall of the abdomen, the longitudinal axis of each artery studied was almost parallel to the Doppler beam. Angle correction was then always inferior to 30° . Each measurement was made three times by one sonographer only, and the three values were averaged. Before this study, the repeatability coefficient (RC) of liver dimensions and mBFV measurements had been investigated in 25 mice at different stages of the disease (Bonnin et al. 2007) according to the formula:

$$RC^2 = \sum D_i^2 / N \quad (2)$$

where N is the sample size, and D_i is the relative differences calculated in two series of paired measurements separated by 30-min intervals (British Standards Institution 1979).

The RC values for intra-observer repeatability were $75 \mu\text{m}$ for D_t , D_a and H and 1.2 and 1.0 cm/s for mBFV in the celiac trunk and superior mesenteric artery, respectively.

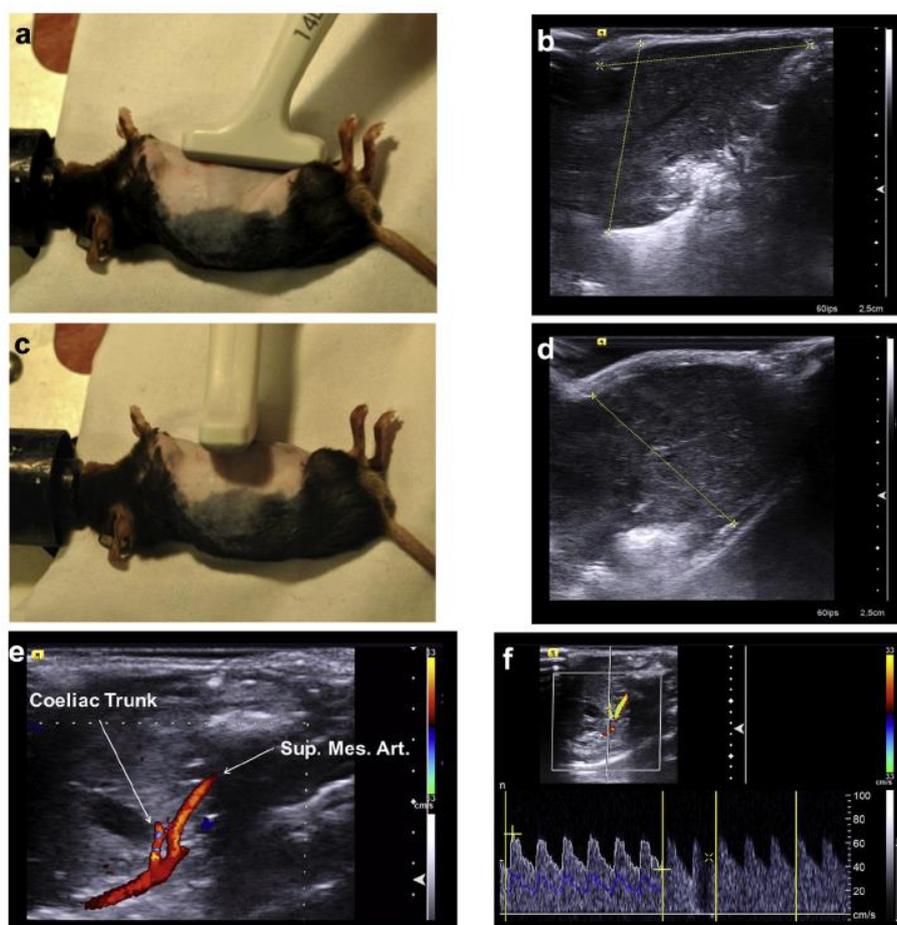


Fig. 2. Measurement of liver volume using a 14-MHz Ultrasound probe in bidimensional mode in the longitudinal (a, b) and transverse (c, d) planes. (e) Localization of the coeliac trunk and the superior mesenteric artery using color Doppler ultrasound in duplex mode. (f) Recording of the spectral analysis of the Doppler signal in the computed tomography image acquired with pulsed Doppler.

Immunofluorescence staining

After sacrifice of animals at week 20, livers from the untreated, bevacizumab-treated and sorafenib-treated groups were obtained for immunofluorescence staining. Livers were flash frozen in liquid nitrogen at 20 wk. Livers were then sliced using a cryostat at -14°C . Liver sections were fixed for 10 min in ice-cold 90% acetone and maintained at -80°C until staining. Liver sections were incubated 1 h at room temperature with 5% bovine serum albumin-phosphate-buffered saline-Tween 0.1% solution for blocking. Then, incubation of three sections per liver with primary antibody against either CD31 (1/50) or Ki67 (1/50) was performed overnight at 4°C . After being washed, liver sections were incubated with the appropriate secondary antibody (1/200). Images were captured and analyzed with a Zeiss Observer Z1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Quantifications

were performed using ImageJ Version 1.49 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Briefly, vessel number per field was calculated manually on images ($\times 40$) on at least five fields/slide, and vascular lumen area was quantified using the outlining tool positioned on vascular lumen limits and set up to measure the area of each outlined lumen vessel. To assess Ki67-positive surface staining, each image was modified after the following steps: (i) modification into HSB stack, (ii) setting of image brightness, (iii) selection of staining threshold using color threshold with dark background (same threshold applied to each image), and (iv) setup of area fraction measurement. This process gave us the fraction area stained for each image; at least five fields/slide were used to obtain consistent results.

Tumor angiogenesis was assessed by staining for CD31, a surface marker of endothelial cells, and

subsequent evaluation of vessel numbers and vascular lumen area per field. For CD31 staining, number of vessels per field (at least five fields/slide) and vascular lumen area were assessed. Tumor proliferation was assessed using Ki67 staining and was expressed as percentage of positive surface.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software (<http://www.r-project.org/>). Data were expressed as means \pm standard deviations. Echo-derived liver volumes and mBFVs were compared using analysis of variance for repeated measurements considering mouse age and treatment, after verification of the normal distribution of the samples using the Shapiro–Wilk test. *Post hoc* paired or unpaired Student's *t*-tests were used to analyze differences in liver volume and mBFVs. Immunofluorescence analysis results were compared using the Wilcoxon test. Differences for US Doppler imaging were taken into account only if the differences in absolute value between two groups were twofold higher than the RC values. All tests were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Sorafenib, but not bevacizumab, inhibits HCC progression in ASV-B mice

Although weights of untreated and bevacizumab-treated ASV-B mice increased similarly between weeks 8 and 20 from 18.6 ± 0.9 to 29.3 ± 2.5 g ($p < 0.0001$) and from 20.2 ± 1.2 to 28.7 ± 1.9 g ($p < 0.0001$), the weights of sorafenib-treated ASV-B mice remained stable in the same time frame (20.5 ± 1.7 g at week 8, 22.7 ± 2.0 g at week 20).

Liver volumes estimated by USI suggested that most of the increase in weight could be accounted for by an increase in liver size. Liver volumes increased fivefold between weeks 8 and 20 without any significant difference between untreated and bevacizumab-treated ASV-B mice (from 1.31 ± 0.32 and 1.51 ± 0.21 cm³ to 7.05 ± 1.03 [$p < 0.0001$] and 7.11 ± 0.93 cm³ [$p < 0.0001$], respectively). In contrast, liver volumes of sorafenib-treated mice remained stable until the 16th wk (1.50 ± 0.4 to 1.75 ± 0.34 cm³) and increased twofold between weeks 16 and 20 (1.50 ± 0.4 to 2.95 ± 1.02 cm³, $p < 0.05$) (Fig. 3a). In the female control mice, liver volume remained stable from 8 to 20 wk at 0.76 ± 0.17 cm³.

In accordance with the evolution of liver size, sorafenib significantly inhibited tumor proliferation as assessed by quantification of the percentage of Ki67-positive mitotic nuclei in histologic sections of livers from treated animals compared with transgenic controls. By contrast, bevacizumab treatment did not significantly

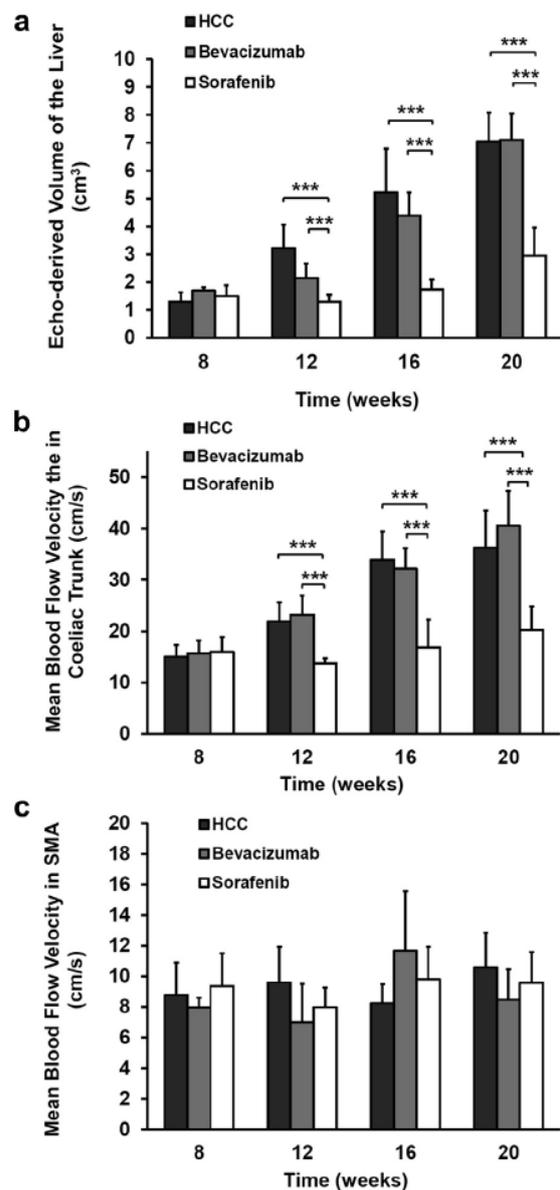


Fig. 3. (a) Echo-derived volume of the liver dramatically increased from 8 to 20 wk in untreated or bevacizumab-treated mice, although it remained stable in sorafenib-treated mice. (b) Mean blood flow velocity (mBFV) measured in the coeliac trunk dramatically increased in untreated and bevacizumab-treated mice, although it remained stable until 16 wk in sorafenib-treated mice, then moderately increased at 20 wk. (c) Mean BFV in the superior mesenteric artery remained stable and did not differ between groups over time at weeks 8, 12, 16 and 20 in each group. $***p < 0.001$, non-treated versus sorafenib-treated or bevacizumab-treated versus sorafenib-treated transgenic mice. HCC = hepatocellular carcinoma.

affect proliferation. Sorafenib inhibited tumor cell proliferation within HCC livers by $>75\%$ compared with untreated ASV-B controls (Fig. 4).

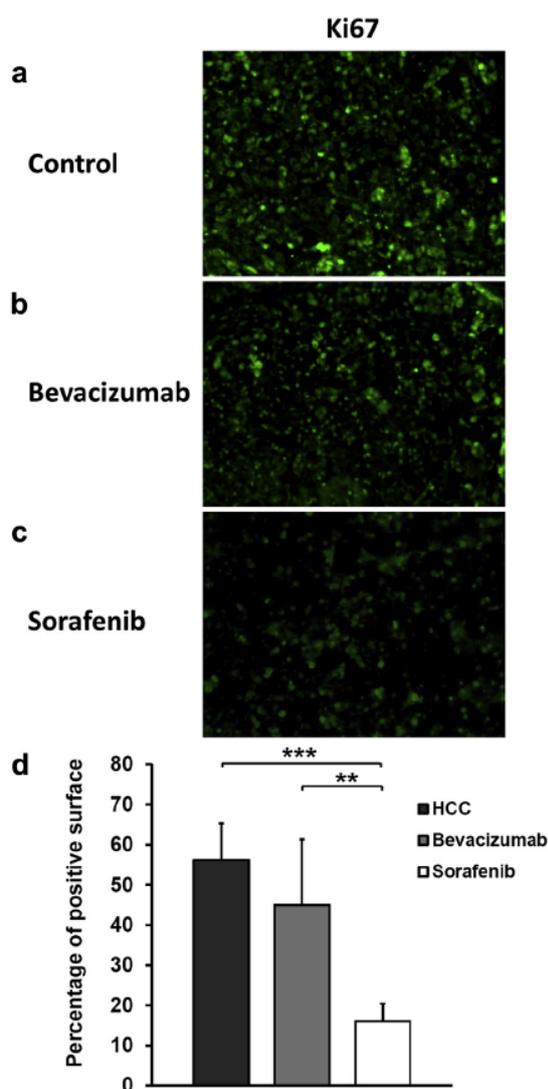


Fig. 4. Ki67 immunostaining of the liver at 20 wk in control untreated mice (a), bevacizumab-treated mice (b) and sorafenib-treated mice (c). No significant difference was observed between untreated and bevacizumab-treated mice, but the percentage of positive Ki67 cells was considerably decreased in sorafenib-treated mice versus untreated ($***p < 0.001$) and bevacizumab-treated ($**p < 0.01$) mice (d). HCC = hepatocellular carcinoma.

Sorafenib, but not bevacizumab, inhibits HCC angiogenesis in ASV-B mice

Mean BFV measured in the celiac trunk increased 2.5-fold from 15.0 ± 2.1 to 36.2 ± 7.3 cm/s in untreated male ($p < 0.0001$) and from 15.7 ± 2.4 to 40.6 ± 6.8 cm/s ($p < 0.0001$) in bevacizumab-treated male mice between weeks 8 and 20. Conversely, in sorafenib-treated ASV-B mice, mBFV measured in the celiac trunk remained stable until week 16 (from 16.3 ± 2.9 to 18.1

± 3.3 cm/s) and reached 20.3 ± 4.5 cm/s at week 20 ($p = 0.0007$ vs. untreated and $p < 0.0001$ vs. bevacizumab-treated mice) (Figs. 3b and 5). In female mice, liver volume and mBFV remained stable (14.2 ± 3.8 cm/s at week 8, 19.7 ± 4.7 cm/s at week 20). As predicted and unlike the celiac trunk, there was no difference between treatment groups in mBFV measured in the superior mesenteric artery. Moreover, there was no significant change over time (Fig. 3c).

In accordance with its known anti-angiogenic effects, sorafenib induced a reduction in the number of vessels compared with control or bevacizumab-treated livers. No differences in vessel numbers were observed between control and bevacizumab-treated livers. In addition, only sorafenib treatment induced a greater than 60% decrease in vascular lumen areas compared with the control (Fig. 6).

DISCUSSION

Our study indicates that US, including B-mode, color-coded, and pulsed duplex Doppler US modes, together provide a robust tool to non-invasively monitor effects of anti-angiogenic treatments on tumor progression and anti-angiogenesis over time in our genetically-induced mouse model of HCC. US readings reliably reveal suppression of tumor growth and angiogenesis by sorafenib in a genetically induced mouse model of HCC, as supported by a significant decrease in tumor vessel density and tumor cell proliferation assessed in histologic sections of livers harvested at the end of the study. The results obtained parallel recent clinical experience with sorafenib treatment for HCC (Fang *et al.* 2012; Frenette 2012).

We previously determined that measurements of mBFV constitute a method for functional evaluation of tumor vascularity in the same HCC model (Bonnin *et al.* 2007). Stabilization of mBFV in the celiac trunk, upstream of the affected liver, provides indirect evidence for the inhibition of vascular network progression in the hepatic tumor, which is in turn coupled to tumor growth. This assumption has been confirmed by histologic analysis in development of HCC (Bergé *et al.* 2010; Vincent *et al.* 2009) as well as in liver metastasis (Eveno *et al.* 2012). Thus, in the absence of expansion of the vascular network of the tumor, the hemodynamic resistance, blood flow volume and mBFV in the artery that feeds this vascular territory (*i.e.*, celiac trunk) remain unchanged in accordance with Poiseuille's law. In an orthotopic murine model of pseudomyxoma peritonei, partly supplied by the superior mesenteric artery, we previously found that (i) the mBFV reached in the superior mesenteric artery upstream of the tumor correlated with peritoneal tumor angiogenesis, (ii) normalization of tumor

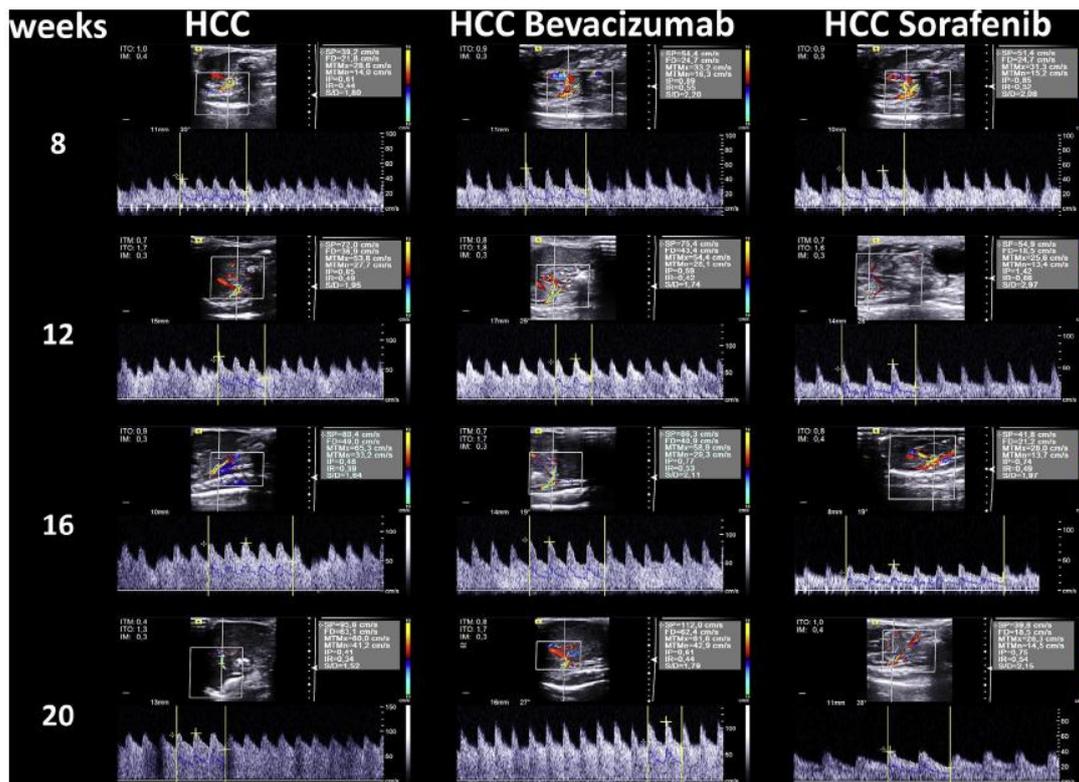


Fig. 5. Doppler velocity waveforms recorded in the celiac trunk in untreated, bevacizumab-treated and sorafenib-treated mice. Mean blood flow velocity dramatically increased from the 8th to the 20th weeks in both untreated and bevacizumab-treated mice, although it slightly increased between the 16th and 20th weeks only in the sorafenib-treated group, indirectly illustrative of inhibition of tumor vascular network development under sorafenib. HCC = hepatocellular carcinoma.

vascularity by anti-angiogenic therapy, as assessed by histologic analysis, correlated with stabilization of hemodynamic parameters (Dohan et al. 2014). Thanks to recent evolution in both hardware and software, high-resolution US devices equipped with high-frequency probes permit a spatial resolution down to $100\ \mu\text{m}$ that facilitates *in vivo* imaging of small animals. US imaging allows easy and repeatable detection and monitoring of morphologic changes by treatment in B-mode. In addition, color-coded and pulsed duplex Doppler US allow functional analysis by assessment of changes in flow velocity in the feeder vessels, which in our model reveal the effects of anti-angiogenic treatments on tumor and endothelial proliferation.

Our purpose was to establish a preclinical method for the evaluation of anti-angiogenic or anti-proliferative effects of therapy in protocols simulating those currently used in clinical practice. Several animal models of HCC have been developed using chemotoxic agents, diet, grafting, and genetic modifications. Each model has similarities with its human counterpart that permit studies of specific aspects of HCC carcinogenesis,

such as the injury–fibrosis–malignancy continuum, the development of steatohepatitis, the capability to metastasize and form satellite nodules or the ability to mimic pathophysiologic and molecular features of HCC. In general, transgenic models reflect the pathophysiologic changes induced by the development of malignancy better than orthotopic and heterotopic xenograft models (De Minicis et al. 2013). We chose the ASV-B genetic model of HCC because it reflects physiologic changes in hepatic vascularization observed in humans, with a specific time course from hyperplasia to diffuse well-differentiated HCC and a fast and optimal rendering (100% of males carrying the transgene develop HCC by 20 wk of age). Previous studies on the ASV-B mouse model using the same US method revealed the efficiency of new potential therapeutic targets (small interfering RNAs, angiotensinogen and neuropilin-1) that modulate survival and rates of tumor growth and angiogenesis, but did not compare these with existing therapies used in clinical routine (Bergé et al. 2010, 2011).

We here assessed the anti-angiogenic effects of sorafenib and bevacizumab between 8 and 20 wk of age, a

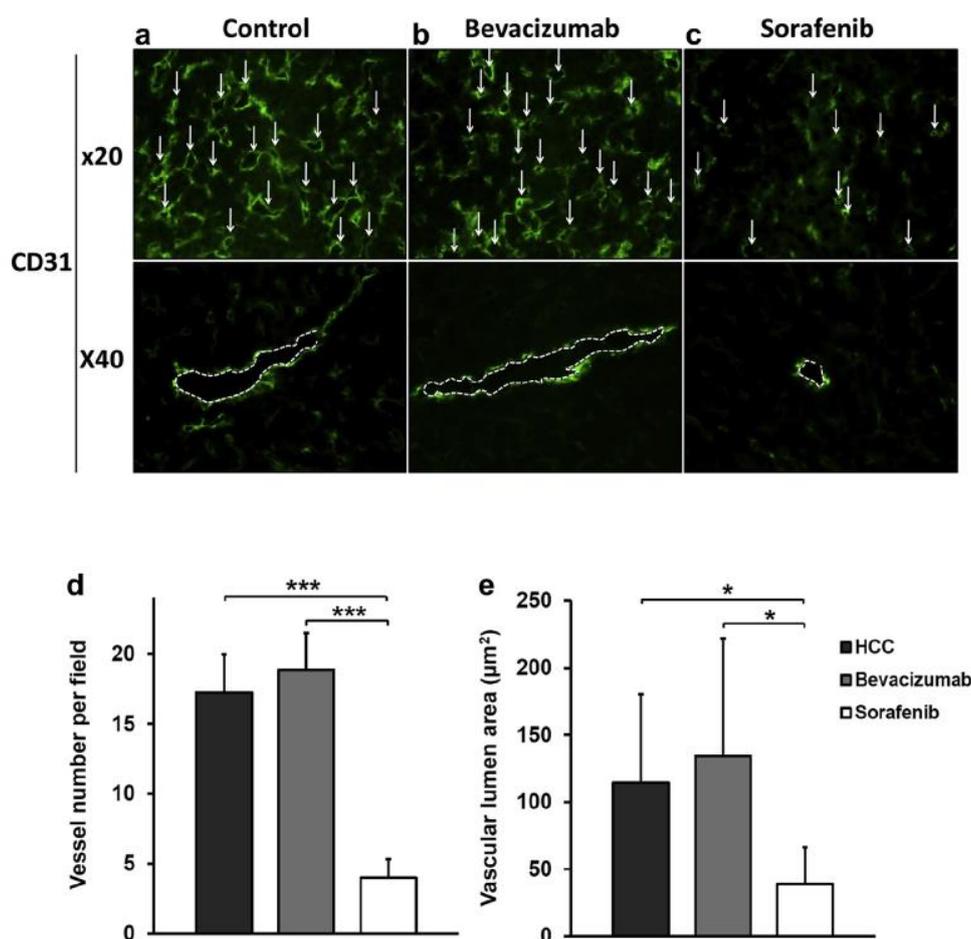


Fig. 6. CD31 immunostaining of the liver in control untreated mice (a), bevacizumab-treated mice (b), and sorafenib-treated mice (c) (top: $\times 20$, bottom: $\times 40$, white arrows indicate the presence of microvessels). Microvascular density evaluated by counting of the vessels per field (d) or calculation of the vascular lumen area (e) decreased considerably in the sorafenib-treated compared with untreated or bevacizumab-treated mice, as assessed by the number of microvessels or vascular surface area. No difference was observed between untreated and bevacizumab-treated mice. (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$). HCC = hepatocellular carcinoma.

period covering all four stages of tumor progression observed in the ASV-B model. Sorafenib induced a substantial reduction in the number of vessels compared with no treatment or bevacizumab. This contrasts previous reports indicating that bevacizumab can inhibit human HCC progression in an orthotopic immunodeficient mouse model (Finn *et al.* 2009). The difference may reflect differences in dosing regimens or differences in the mouse models used. The transgenic model used in our study may have a more complex tumor microenvironment that is more resistant to the highly selective anti-angiogenic targeting provided by bevacizumab. We indeed observed that tumor progression in ASV-B mice is predominantly under the governance of placental growth factor and that the contribution of vascular

endothelial growth factor is negligible (Raballand *et al.*, unpublished observations). Differences between murine and human vascular endothelial growth factor could also explain the relative inefficacy of bevacizumab in our study (Sitohy *et al.* 2012). Contrary to bevacizumab, sorafenib is a multikinase inhibitor with anti-proliferative and anti-angiogenic effects (Llovet *et al.* 2008; Strumberg 2005) and may thus be more efficacious in ASV-B mice because of its broad action.

CONCLUSIONS

Doppler US presents a non-invasive tool complementary to standard histopathologic methods for studies of angiogenic modifications induced by routinely used

anti-angiogenic drugs in experimental models of HCC. Our findings mimic results obtained in clinical trials using sorafenib and bevacizumab and may thus be considered as a bench test for preclinical exploration of emerging anti-angiogenic therapies. Further studies are required to validate the use of this method in other experimental models, notably with high tumor vascularity, and in clinical oncology.

Acknowledgments—We thank Nathalie Jourdan Desrayaud and Géraldine Michel, Hospital Saint-Louis pharmacy, for providing the drugs used in the present work; Eric Camerer for help with language editing; and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Matthias Barral) and the “Region Ile-de-France” (CORDDIM) for funding.

REFERENCES

- Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, Deremer DL, Somanath PR. Anti-angiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacotherapy* 2012; 32:1095–1111.
- Bergé M, Bonnin P, Sulpice E, Vilar J, Allanic D, Silvestre JS, Lévy BI, Tucker GC, Tobelem G, Merkulova-Rainon T. Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2010;177:3192–3201.
- Bergé M, Allanic D, Bonnin P, de Montron C, Richard J, Suc M, Boivin JF, Contrères JO, Lockhart BP, Pocard M, Lévy BI, Tucker GC, Tobelem G, Merkulova-Rainon T. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling. *J Hepatol* 2011;55:866–875.
- Bonnin P, Villemain A, Vincent F, Debbabi H, Silvestre JS, Contrères JO, Lévy BI, Tobelem G, Dupuy E. Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:561–570.
- British Standards Institution. Precision of test method (BS5497, part 1). London: Author; 1979.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: A phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10:25–34.
- De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D, Alvaro D, Alpini G, Marziani M. Liver carcinogenesis: Rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2013;45:450–459.
- Dohan A, Lousquy R, Eveno C, Goere D, Broqueres-You D, Launay JM, Soyer P, Bonnin P, Pocard M. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: An original *in-vivo* model to test antiangiogenic drug effects. *Am J Pathol* 2014;184:1920–1929.
- Dubois N, Bennoun M, Allemand I, Molina T, Grimber G, Daudet-Monsac M, Abelanet R, Briand P. Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J Hepatol* 1991;13:227–239.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–1127.
- Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, Soyer P, Rampanou A, Nemeth J, Brouland JP, Dupuy E, Pocard M, Bonnin P. Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:1195–1204.
- Fang P, Hu JH, Cheng ZG, Liu ZF, Wang JL, Jiao SC. Efficacy and safety of bevacizumab for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: A systematic review of phase II trials. *PLoS One* 2012;7:497–517.
- Finn RS, Bentley G, Britten CD, Amado R, Busuttil RW. Targeting vascular endothelial growth factor with the monoclonal antibody bevacizumab inhibits human hepatocellular carcinoma cells growing in an orthotopic mouse model. *Liver Int* 2009;29:284–290.
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379:1245–1255.
- Frenette CT. Current status of bevacizumab for advanced hepatocellular carcinoma. *Chin Clin Oncol* 2012;1:13.
- Griffin J. The biology of signal transduction inhibition: Basic science to novel therapies. *Semin Oncol* 2001;28:3–8.
- Hoit BD, Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Olszens K, Shao H, Pao YH, Nadeau JH. Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred mouse strains. *Genomics* 2002;79:679–685.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–390.
- Peck-Radosavljevic M. Drug therapy for advanced-stage liver cancer. *Liver Cancer* 2014;3:125–131.
- Sessa C, Guibal A, Del Conte G, Rüegg C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:378–391.
- Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target. *Cancer Res* 2012;72:1909–1914.
- Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today* 2005; 41:773–784.
- Vincent F, Bonnin P, Clemessy M, Contrères JO, Lamandé N, Gasc JM, Vilar J, Hainaud P, Tobelem G, Corvol P, Dupuy E. Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* 2009;69:2853–2860.

3.2 Pseudomyxome péritonéal chez l'homme

1. Dohan A, **Barral M**, Eveno C, Lo Dico R, Kaci R, Pasteur-Rousseau A, Soyer P, Pocard M, Bonnin P. Prediction of clinical outcome using blood flow volume in the superior mesenteric artery in patients with pseudomyxoma peritonei treated by cytoreductive surgery. *Eur J Surg Oncol.* **2017**;43:1932-1938.
2. **Barral M**, El Sanharawi I, Eveno C, Dohan A, Launay JM, Lo Dico R, Pocard M, Bonnin P. Post-operative wall shear stress in the superior mesenteric artery: biomarker of long term outcome in patients with residual disease after incomplete cytoreductive surgery for pseudomyxoma peritonei. *Eur J Surg Oncol.* **2019 Mar 6.** *pii: S0748-7983(19)30308-7. doi: 10.1016/j.ejso.2019.03.001.*

3.2.1 Introduction

Le pseudomyxome péritonéal (PMP) ou maladie gélatineuse du péritoine est une tumeur rare du péritoine d'origine appendiculaire le plus souvent et qui est caractérisée par une atteinte péritonéale diffuse, mucineuse et paucicellulaire. Le PMP souffre de difficultés diagnostiques liées à l'absence de marqueurs biologiques ou anatomopathologiques spécifiques et fiables. Son diagnostic repose sur un faisceau d'arguments clinico-biologico-radiologiques. Le traitement chirurgical par cytoréduction complète et chimiothérapie hyperthermie intra péritonéale (CHIP) permet une augmentation significative de la survie des patients avec une survie globale de l'ordre de 70% [126]. Toutefois, la survie des patients dépend de la totalité de la résection, du grade de la tumeur et de l'état général du patient. En cas de résection incomplète avec une maladie résiduelle macroscopique, la stratégie de traitement est débattue. Certains patients ont une maladie agressive avec une récurrence précoce des symptômes (douleurs abdominales et dénutrition), et devraient relever d'un traitement systémique. D'autres

patients sont atteints d'une maladie lentement progressive avec une qualité de vie conservée et des symptômes limités qui justifient d'une surveillance active. À ce jour, il n'existe aucun critère clinique, biologique ou pathologique fiable permettant d'évaluer l'activité du PMP et de distinguer les PMP agressifs des moins agressifs. L'évaluation par imagerie des patients atteints de PMP est basée sur un examen morphologique tel qu'une TDM ou une IRM, mais il n'existe pas de critères standardisés bien établis comme ceux utilisés pour les tumeurs solides.

Il a été démontré sur un modèle de xénogreffe orthotopique de PMP sur souris *Nude* que les vitesses moyennes dans l'artère mésentérique supérieure (AMS) mesurées par échographie Doppler étaient augmentées et que leur diminution était corrélée à l'effet d'un traitement antiangiogénique (bevacizumab) [127].

Les objectifs des deux études étaient d'évaluer chez les patients atteints de PMP les performances de la mesure par échographie Doppler dans l'AMS des vitesses circulatoires, des débits et des forces de cisaillement

- 1) En préopératoire afin de prédire l'étendue et la résecabilité de la maladie
- 2) En postopératoire chez les patients avec une maladie résiduelle macroscopique afin de prédire l'évolution de la maladie.

3.2.2 Résultats et conclusions

Ces deux études ont mis en évidence une augmentation significative des vitesses circulatoires et des débits dans l'AMS des patients atteints de PMP corrélée à l'étendue de la maladie. Par ailleurs, nous avons constaté en postopératoire chez les patients ayant une résection chirurgicale incomplète, que la mesure de la vitesse et des forces de cisaillement aide à distinguer un PMP agressif et d'un PMP lentement progressif. En effet, les patients ne présentant pas de maladie résiduelle ou une maladie lentement

évolutive après une chirurgie présentait des vitesses et des forces de cisaillement normales par rapport aux témoins. Tandis que les patients avec une maladie progressive un an après la chirurgie, objectivée par la rechute clinique radiologique et biologique 6 mois après l'examen échographie Doppler, avaient des vitesses et des forces de cisaillement plus élevées. Des forces de cisaillement mesurées à plus de 12,1 dynes / cm² et une vitesse moyenne augmentée, mesurées dans l'AMS étaient associées à un moins bon pronostic chez les patients présentant une maladie résiduelle avec une sensibilité et une spécificité de 100%. L'augmentation des forces de cisaillement en amont refléterait un remodelage artériel expansif en cours, consécutif à l'extension actualisée du réseau vasculaire pathologique. Par ailleurs, la réalisation d'un remodelage artériel (c'est-à-dire l'augmentation du diamètre artériel) avec pour conséquence la normalisation des forces de cisaillement reflétait la stabilité du PMP quel que soit le niveau de débit. Enfin, la mesure des forces de cisaillement est plus indicative sensible et prédictive que celle du diamètre interne de l'artère, du débit ou des vitesses circulatoires moyennes dans l'AMS pour prédire l'évolution clinique un an après la chirurgie.



Prediction of clinical outcome using blood flow volume in the superior mesenteric artery in patients with pseudomyxoma peritonei treated by cytoreductive surgery

A. Dohan^{a,b}, M. Barral^{a,b}, C. Eveno^{a,c}, R. Lo Dico^{a,c}, R. Kaci^{a,d},
A. Pasteur-Rousseau^{a,e}, P. Soyer^{a,b}, M. Pocard^{a,c}, P. Bonnin^{a,e,*}

^a CART, INSERM UMR965, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Hôpital Lariboisière, Paris, France

^b AP-HP, Hôpital Lariboisière, Radiologie Viscérale et Vasculaire, F-75010, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Lariboisière, Chirurgie Digestive et Oncologique, F-75010, Paris, France

^d APHP, Hôpital Lariboisière, Anatomopathologie, F-75010, Paris, France

^e AP-HP, Hôpital Lariboisière, Physiologie Clinique – Explorations Fonctionnelles, F-75010, Paris, France

Accepted 11 May 2017

Available online 25 May 2017

Abstract

Background: Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare carcinomatosis limited to the peritoneal cavity, mainly supplied by the superior mesenteric artery (SMA). The only curative treatment is cytoreductive surgery (CRS) associated with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. This study aimed to evaluate the ability of blood flow volume (BFV) recorded in the SMA using Doppler ultrasonography pre-operatively to predict the extent and resectability of the disease and post-operatively to assess clinical outcome.

Methods: BFV was measured in the SMA of forty-nine patients before and the year following CRS. Patients were categorized in 3 groups according to clinical and surgical outcomes: group-1 (n = 22): patient with completed CRS, group-2 (n = 16): incomplete resection with slowly progressive disease (alive at 2 years without severe clinical symptoms), group-3 (n = 11): incomplete resection and with severe clinical symptoms or dead within two years.

Results: Pre-operative mean SMA BFV was higher in group-2 (510 mL/min, $p = 0.027$) and in group-3 (572 mL/min, $p = 0.004$) than in group-1 (378 mL/min). After surgery, BFV dropped to normal values (203 mL/min, $p = 0.001$) in group-1, and to 423 mL/min ($p = 0.047$) in group-2. It remained elevated in group-3 (626 mL/min, $p = 0.566$). BFV allowed stratification of 1) resectability before CRS (group-2 and -3 vs group-1, area under the ROC curve: 0.794 [0.650–0.939]), and 2) non progression after incomplete CRS (group-3 vs group-2, area under the ROC curve: 0.827 [0.565–1.00]).

Conclusions: Pre-operative BFV in the SMA correlates with extent and resectability of PMP. After incomplete surgery, post-operative BFV might aid in identifying patients who may benefit of post-operative therapy.

© 2017 Elsevier Ltd, BASO ~ The Association for Cancer Surgery, and the European Society of Surgical Oncology. All rights reserved.

Keywords: Pseudomyxoma peritonei; Cytoreductive surgery; Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy; Doppler ultrasonography; Superior mesenteric artery

Introduction

Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare disease with an estimated incidence of one to two per million per year

that is characterized by diffuse intra-abdominal gelatinous ascites.¹ The only curative treatment for PMP consists of a combination of cytoreductive surgery (CRS) with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC).² When resection is complete, this treatment may achieve a 20-year survival rate of 70%.^{3,4}

The World Health Organization (WHO) has recently classified PMP into two pathological categories: low and

* Corresponding author. Physiologie Clinique - Explorations-Fonctionnelles, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, F-75475 Paris CEDEX10, France. Fax: +33 (0)1 49 95 86 71.

E-mail address: philippe.bonnin@aphp.fr (P. Bonnin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsso.2017.05.015>

0748-7983/© 2017 Elsevier Ltd, BASO ~ The Association for Cancer Surgery, and the European Society of Surgical Oncology. All rights reserved.

high grade tumors. While some studies suggested that the grade correlates with prognosis (overall 5-year survival of 63% for low grade and 23% for high grade respectively),^{1–5} others have suggested that recurrence and survival are quite variable for PMP of the same grade.⁶

When complete surgical resection is not achievable, therapeutic options are limited. Many oncologists propose the same chemotherapy regimen as that used in colorectal cancer; especially in case of high grade PMP.⁷ Others have suggested the use of anti-angiogenic agents, which have conferred benefits in case studies.⁸ However, clinical outcome in PMP is not related to disease grade alone as some patients with high grade disease may have few symptoms and live longer than those with lower grades whose disease may be complicated by compression of digestive structures and severe clinical symptoms leading to death.⁶ Low grade PMP is far more frequent than high grade PMP (78 vs 22%, respectively), and among patients with low grade PMP, those with slowly progressive disease will benefit of a therapeutic pause, while patients with aggressive disease may benefit of a post-operative chemotherapy and anti-angiogenic agents as high grade PMP.^{7,9}

To date, there are no clinical, biological or pathological criteria to assess the activity of PMP and to distinguish between aggressive and less aggressive PMP. Imaging evaluation of patients with PMP is based on morphological examination such as computed tomography or magnetic resonance imaging (MRI), but assessment of progression or stability of the disease is difficult as there are no standardized and not well-established criteria as those used for solid tumors.¹⁰ Numerous studies have demonstrated that Doppler ultrasonography (Doppler-US) of the arteries supplying the alimentary tract is a reliable imaging modality to monitor blood flow velocities (BFVels) or blood flow volume (BFV) in inflammatory bowel disease and hepatic malignancies.^{11–13} Moreover, it has been suggested that measurement of the BFVels or BFV in the feeding artery upstream of the tumor vascular network allows for the semi-quantitative analysis of the development or the involution of tumor vasculature.^{14,15} Of note, Dohan et al. have demonstrated that Doppler-US of the superior mesenteric artery (SMA) can be used to monitor tumor angiogenesis and response to antiangiogenic therapy after CRS in an orthotopic murine model of PMP.¹⁶

As blood flow is supplied to PMP mainly from the SMA, we anticipated that the increased blood supply to the PMP would be reflected in BFV in this vessel, which had never been evaluated before. The objectives to the current study were to evaluate the ability of BFV recorded in the SMA by Doppler-US, 1) pre-operatively to predict the extent and resectability of PMP and 2) post-operatively to assess clinical outcome in patients with PMP.

Patients and methods

Patient cohort

After IRB approval, all patients gave their informed consent to be enrolled in this prospective single center study, from October 1st, 2011 to October 1st 2016. Patients were included into the study when they were scheduled to undergo surgical resection of PMP or after surgery. The first step of the surgical procedure was a peritoneal exploration with determination of the peritoneal carcinomatosis index (PCI) followed by the decision to perform HIPEC.^{4,17} All patients had a pathological analysis with an evaluation of the tumor grade according to the WHO classification.⁵

The study population comprised 49 consecutive patients, 22 (45%) men and 27 (55%) women, with a mean age of 57 [26–87] years (mean [min–max]). Among these 49 patients, 41 (82%) had SMA BFV measurement during the month (mean: 1.3 months) before the CRS, and 30 (60%) within the 6–12 months following surgery (10.1 [6.1–11.9] months). Twenty two (45%) patients had Doppler-US examination before and after surgery, 19 (39%) only before surgery, 8 (16%) only during follow-up. A group of 14 healthy patients was constituted as a control group to determine the normal values of SMA BFV (Fig. 1).

Classification of patients according to clinical outcome

Patients were distributed into 3 groups according to their clinical and surgical outcome as follows. Completeness of resection was graded according to Sugarbaker's complete cytoreduction (CCR) score as follows: CCR0: no residual tumor; CCR1: residual tumor < 0.25 cm; CCR2: residual tumor between 0.25 and 2.5 cm; CCR3: residual tumor > 2.5 cm.⁴

- *Group-1*: patients with complete resection (CCR0 or CCR1 score), HIPEC and absence of recurrence within two years after surgery or at last follow-up ($n = 22$, among them, 6 patients had SMA BFV measurements before and after surgery);
- *Group-2*: patients with incomplete resection (CCR2 or CCR3 score) with slowly progressive disease: alive 2 years after surgery or at last during follow-up without severe clinical symptoms (performance status = 0 or 1), ($n = 16$, among them, 11 patients had SMA BFV measurements before and after surgery);
- *Group-3*: patients with incomplete resection (CCR2 or CCR3 score) with severe active progressive disease: dead within 2 years after surgery or with severe clinical symptoms (performance status >1), ($n = 11$, among them, 5 patients had SMA BFV measurements before and after surgery).

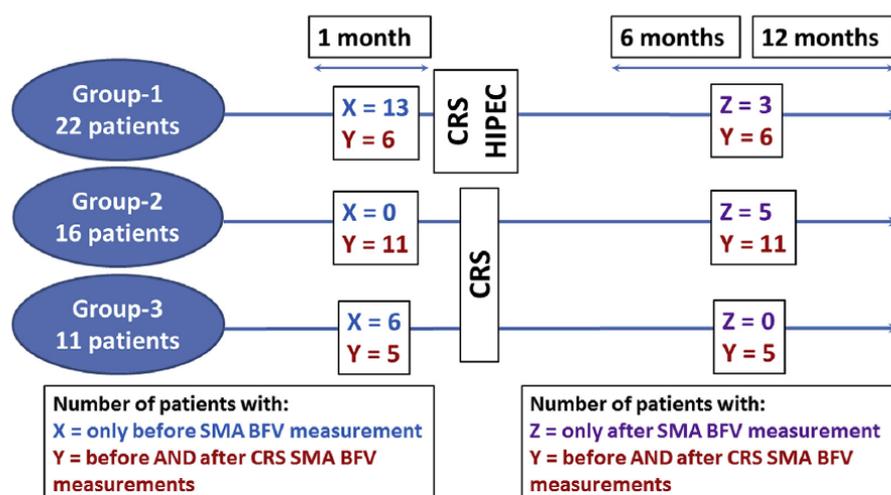


Figure 1. Flow chart of patient enrolled in the study. SMA BFV indicates superior mesenteric artery blood flow volumes, CRS, cytoreductive surgery, HIPEC, hyperthermic intra peritoneal chemotherapy.

Superior mesenteric artery ultrasound imaging

The sonographer was blinded to the clinical and radiological status of each patient; the surgeon and the radiologist were blinded to the SMA BFV. The SMA BFV was not included as an element of the surgical decision or as an element of the follow-up.

Doppler-US was performed at rest in patients in 45° seat-position after an overnight fast using an ultrasound scanner (Acuson S2000[®], Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a curvilinear transducer type CH4-1 (6–4 MHz) as previously described.¹¹ The SMA was studied in its long axis in the sagittal plan. M-mode was activated for measurement of inner diameters. Pulsed Doppler was activated for blood flow velocity (BFVel) waveforms acquisition 2–3 cm after the SMA origin. Great attention was given to angle correction application in order to record accurate velocities. Spatial-average-time-average BFVel was calculated from the spectral analysis of the Doppler signal by integrating the area under instantaneous mean velocity curve. BFV was calculated using the following formula: $BFV = [(BFVel \cdot 0.60) \cdot (\pi \cdot (D/2)^2)]$, where BFV is the blood flow volume in mL/min, BFVel is the spatial-averaged-time-averaged mean blood flow velocity in cm/s, and D the SMA diameter in cm. For each patient, BFV was measured five times during quiet breathing and averaged.

Accuracy of the superior mesenteric artery blood flow volume measurement

Repeatability of SMA diameter, BFVel and BFV measurements was investigated in the controls through the calculation of the repeatability coefficient (RC) (British Standards Institution Precision of Test Method).¹⁸ Two

series of paired measurements separated by 2 min interval performed by the same investigator were compared according to the formula: $RC^2 = \Sigma Di^2/N$, where N is the sample, Di is the relative (positive or negative) differences within each pair of measures. This coefficient is the standard deviation of the estimated difference between two repeated measurements. The RC values for intra-observer repeatability were 0.05 mm for the inner diameter, 0.4 cm/s for the spatial-average–time-average mean blood flow velocity and 5.0 mL/min for the BFV.

Blood tests

All patients had carcinoembryonic antigen (CEA) serum level measurement before and after surgery. For the 13 patients who were included after surgery, pre-operative CEA was collected retrospectively. Carbohydrate antigen CA125 and CA19-9 were not routinely collected and not available for all patients.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as mean [min–max]. The Gaussian distribution of the continuous variables was assessed using the Shapiro–Wilk test. Survival curves in the 3 groups were estimated according to the Kaplan–Meier method. Comparisons between the survivals of the different groups were performed using the Log-rank test. Categorical data were analyzed using the Chi-squared test or Fischer's exact test when appropriate, whereas differences in continuous variables (SMA BFV, and CEA serum level) before and after CRS, according to the patients groups were analyzed with a two-way ANOVA with post-hoc Bonferroni correction and paired or unpaired Student

t-test. For the 22 patients with both pre- and post-operative value of SMA BFV, an ANOVA for repeated measurements was performed between pre- and post-operative values with patients groups as between-subjects factor. A polynomial regression was calculated between the pre-operative SMA BFV and the PCI. A receiver operating characteristics (ROC) curve of pre- or post-surgical BFV was built and a cut-off value was calculated to discriminate 1) between patients who benefited from completeness of resection from the others or 2) between patients who had severe active progressive disease (group-3) from those with slowly progressive disease (group-2). Areas under curves (AUC) were calculated. Sensitivity and specificity obtained with the respective cut-off BFV values were calculated (MedCal® Software, Mariakerke, Belgium). *P* values < 0.05 were considered significant.

Results

Survival

Overall survival was higher in group 1 than in group 2 (*p* = 0.003), in group-1 than in group-3 (*p* < 0.001) and in group-2 compared to group-3 (*p* = 0.021) (Fig. 2). There was no difference in age, sex ratio and low/high grade ratio between the three groups. PCI were different between group-1 (16 [0–39]) vs group-2 (31 [20–39], *p* < 0.001) and group-3 (33 [23–39] vs group-1, *p* < 0.001). There was no difference in PCI between group-2 and group-3 (*p* = 0.453). Affected areas counts were also different between group-1 (7 [1–13]), group-2 (12 [9–13], *p* = 0.002)

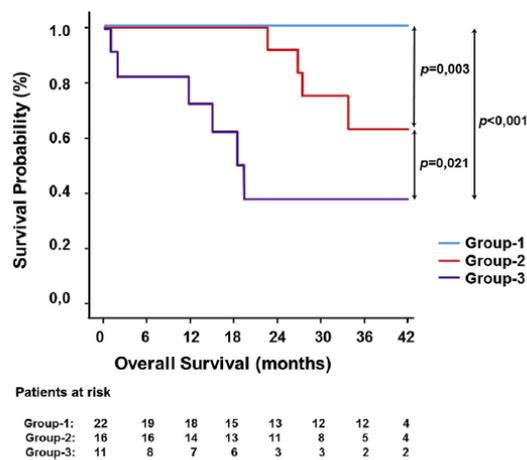


Figure 2. Survival curves in the three different groups of patients. Patients with completed CRS and HIPEC (group-1) were alive after 2 years. Survival of patients with uncompleted CRS and progressive PMP was lower than group-1 (group-3 vs group-1, *p* < 0.001), and survival of patients with uncompleted CRS and slowly progressive PMP was also slower than group-1 (group-2 vs group-1, *p* = 0.003). Survival was higher in group-2 compared to group-3 (*p* = 0.021).

and group-3 (13 [12–13], *p* < 0.001 vs group-1), without any difference between group-2 and group-3 (*p* = 0.270). Patients’ characteristics are summarized in Table 1.

Pre-operative blood flow volume measurements

Before surgery, BFV in the SMA was lower in group-1 than in group-2 (378 [220–779], vs 510 [338–840] mL/min respectively; *p* = 0.027) and that in group-3 patients (572 [265–889] mL/min, *p* < 0.001, Table 1). No difference was observed in baseline BFV between group-2 and group-3 patients (*p* = 0.388) (Fig. 3a). We found a polynomial regression between the baselines BFV and PCI (*R* = 0.65, *p* < 0.001, Fig. 3b). There was no difference in baseline BFV between patients with high histological grade (488 [225–775] mL/min) and patients with low grade (434 [220–889] mL/min, *p* = 0.429).

A ROC curve showed the ability of pre-operative BFV to distinguish resectable (group-1) from unresectable PMP (groups-2 and -3). The area under the curve (AUC) was 0.794 [95%CI: 0.650–0.932]. A pre-operative BFV >450 mL min⁻¹ yielded a sensitivity of 68.2% and a specificity of 78.9% for predicting incomplete resection (group-2 or -3) (Fig. 4a).

Post-surgical blood flow volume measurements

In group-1, BFV in the SMA dropped from 378 [200–779] to 214 [150–265] mL/min (*p* = 0.001) after surgery reaching values of healthy controls (236 [179–309] mL/min, *p* = 0.091). In the group-2 the BFV decreased from 510 [338–840] to 406 [265–630] mL/min, (*p* = 0.026). No effect of surgery was found regarding the BFV in group-3 (572 [265–889] before to 645 [528–773] mL/min after surgery, *p* = 0.057). Two-way ANOVA showed a significant interaction between patients groups and pre-/post-operative SMA BFV values (*p* = 0.037) illustrative of the drop in SMA BFV after surgery in group-1 and -2, and the trend of increase in the group-3. For the 22 patients with both pre- and post-operative Doppler-US examinations, the pre- and post-operative SMA BFV modifications were highly significant between the three groups (*p* < 0.001, ANOVA for repeated measurements). In group-2, 5/16 (31%) patients and in group-3, 3/11 (27%) patients had post-operative chemotherapy (*p* = 0.360). The use and the type of chemotherapy was: Folinic acid and 5-Fluorouracil associated to Oxaliplatin (FOLFOX) (*n* = 5) or Irinotecan (FOLFIRI) (*n* = 3). No difference in BFV was found between patients who did and did not receive post-operative chemotherapy.

A ROC curve showed the ability of post-operative BFV to distinguish group-2 from group-3 patients. The AUC was 0.827 [95%CI: 0.565–1.00]. A post-operative BFV >530 mL min⁻¹ yielded a sensitivity of 80.0% and a specificity of 93.3% for the diagnosis of aggressive PMP (group-3) (Fig. 4b).

Table 1
Patients' baseline characteristics, Doppler ultrasonography and laboratory findings.

		Group-1 (n = 22)		Group-2 (n = 16)		Group-3 (n = 11)		One-way or two-way ANOVA, <i>p</i> value	
Age (years)	Mean	56		58		57		0.874	
	(SD)	(14)		(13)		(14)			
	[range]	[26–76]		[35–73]		[34–87]			
Gender	Women	15		6		6		0.172	
	Men	7		10		5			
Grade	Low	19		12		9		0.671	
	High	3		4		2			
PCI	Mean	16		31		33		<0.001	
	(SD)	(11)		(7)		(6)			
	[range]	[0–39]		[20–39]		[23–39]			
Affected areas count	Mean (SD)	7		12		13		<0.001	
	[range]	(5)		(1)		(1)			
	[range]	[1–13]		[9–13]		[12–13]			
Delay between diagnosis and surgery (month)	Mean (SD)	34		7		55		0.181	
	[range]	(56)		(8)		(90)			
	[range]	[0–159]		[1–31]		[2–258]			
Post-operative chemotherapy	yes	0		5		3		0.360	
	no	23		11		8			
		Before CRS	After CRS	Before CRS	After CRS	Before CRS	After CRS	Between groups <i>p</i> value	After/Before <i>p</i> value
SMA BFV (mL/min)	Mean	378	214***	510	406*	572	645	<0.001	0.069
	(SD)	(151)	(46)	(146)	(101)	(184)	(107)		
	[range]	[220–779]	[150–265]	[338–840]	[265–630]	[265–889]	[528–773]		
Delay Doppler-US/Surgery (month)	Mean	1.0	–	1.0	–	0.9	–	0.941	–
	(SD)	(0.8)		(0.7)		(0.7)			
	[range]	[0.3–2.5]		[0.2–2.3]		[0.2–2.7]			
Delay Surgery/ Doppler-US (month)	Mean	–	10.4	–	9.7	–	9.8	0.961	–
	(SD)		(2.1)		(2.3)		(2.3)		
	[range]		[7.0–11.9]		[5.1–11.8]		[6.1–11.6]		
ACE (µg/l)	Mean	41	6	16	82	31	51	0.762	0.581
	(SD)	(87)	(7)	(20)	(241)	(25)	(11)		
	[range]	[1–304]	[1–16]	[1–50]	[1–600]	[1–67]	[39–60]		

SD standard deviation, PCI Peritoneal Cancer Index, SMA BFV Blood flow volume in the superior mesenteric artery, CRS cytoreductive surgery; **p* < 0.05, ****p* < 0.001 after vs before CRS.

Blood tests

Pre- and post-operative CEA serum levels were not different among the 3 groups (Table 1).

Discussion

This study demonstrates that pre-operative BFV measured in the SMA with Doppler-US correlates with surgical PCI and might be helpful to predict resectability. SMA BFV measurements showed an interesting predicting value for incomplete resection (sensitivity of 68.2% and specificity of 78.9%). Moreover, we found that post-operative SMA BFV may help discriminate between aggressive and slowly progressive PMP in patients who have incomplete surgical resection, with a sensitivity of 80.0% and a specificity of 93.3%. This technique may help early stratify patients with a poor prognosis and those who might benefit of additional chemotherapy. Conversely, patients with slowly progressive PMP as identified using

post-operative BFV measurement may be considered for withdrawal from therapy.

We found that patients who had complete CRS and HIPEC (group-1) had post-operative SMA BFV values similar to those of healthy controls. These patients are assumed to have a very good prognosis. The return to normal BFV values in the SMA after surgery suggests the absence of renewed tumor vascular network development and thus the absence of recurrence of the PMP. Conversely, a persistently high SMA BFV one year after surgery suggests continued progression of the tumor vasculature to meet metabolic needs, thus reflecting recurrence of the disease.

According to Poiseuille's law, local BFV is adjusted by variations of local hemodynamic resistance.¹⁹ When tumor tissues develop on or in an organ, metabolic demands increase, inducing sprouting angiogenesis from the vascular network of the native organ, resulting in an extension of the micro-vascular network downstream from the feeding artery of the affected organ. Local hemodynamic resistance thus falls and the BFV in the feeding artery increases.

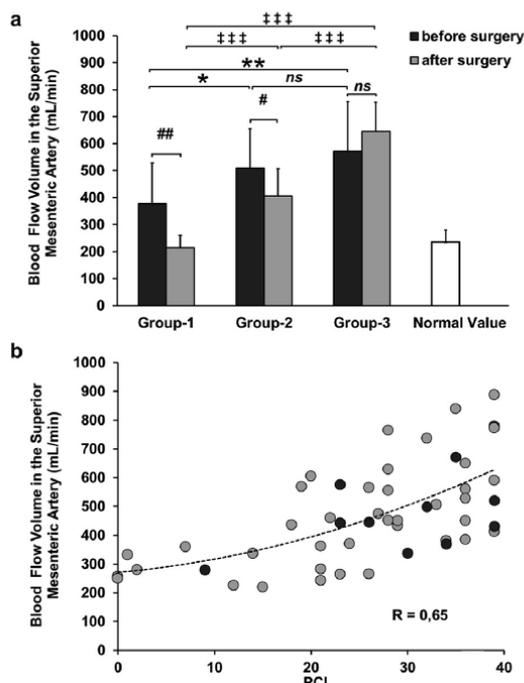


Figure 3. (a) Blood flow volume (BFV) in the superior mesenteric artery (SMA) before and after surgery. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, baseline BFV in the SMA related to the patients groups; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, BFV measured before and after surgery; ### $p < 0.001$, BFV measured after surgical treatment related to patients groups). (b) Polynomial regression between blood flow volume (BFV) measured in the superior mesenteric artery (SMA) and peritoneal carcinomatosis index (PCI) before surgery. Tumours grade are noted with coloured dot. (● low grade, ● high grade).

Although it has been suggested, but only in small-scale studies, that tumor grade correlates with vascularity and degree of enhancement on MRI or degree of glucose uptake on positron emission tomography,^{20,21} pre-operative SMA BFV did not correlate with tumor grade in our study. Moreover, it has been suggested that CEA levels may aid follow-up decisions in high grade PMP, but serum CEA levels did not reflect tumor activity, PCI or disease free survival.²²

There was no difference in survival between patients with low and high grade PMP in our series, but this might be because of the low rate of high grade patients. As PMP is rare and high grade PMP less frequent than low grade PMP, validation of criteria predicting the grade would require a larger number of patients which is rarely achieved in imaging studies.²³

Unresectable high grade PMP is usually treated with chemotherapy and there is no consensus on the management of unresectable low grade PMP. Our study shows that SMA BFV might be helpful to stratify patients with indication of antiangiogenic treatment (high-perfused PMP).^{8,16} Our hypothesis was that a decrease in SMA BFV was related to the decrease in tumor burden and to

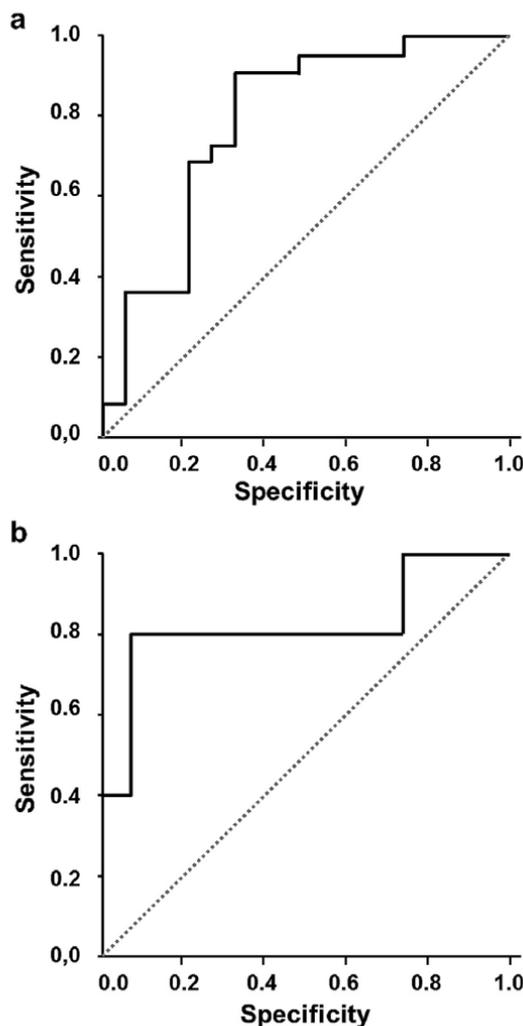


Figure 4. (a) Graph shows ROC curves for pre-surgical BFV in differentiating between patients with resectable PMP (group-1) and patients with unresectable PMP (groups-2 and -3). The area under the curve was 0.794 [95%CI: 0.650–0.932]. A pre-operative BFV $> 450 \text{ mL min}^{-1}$ yielded a sensitivity of 68.2% and a specificity of 78.9% for predicting incomplete resection (group-2 or -3). (b) Graph shows ROC curves for post-surgery BFV in differentiating between patients with aggressive PMP (group-3) and patients with slowly progressive PMP (group-2). The area under the curve was 0.827 [95%CI: 0.565–1.00]. A post-operative BFV $> 530 \text{ mL min}^{-1}$ yielded a sensitivity of 80.0% and a specificity of 93.3% for the diagnosis of aggressive disease (group-3).

the decrease of angiogenic activity of the tumor. This functional relationship has been previously shown in a murine model of PMP.¹⁶

While our cohort was small (49 patients), it was nevertheless sizeable for a single-center prospective study PMP and a rare disease. Our rare cancer group network (RENAPE) treated ~ 100 patients affected by PMP during the last 10

years. Follow-up was in some cases compromised by distance from patients home and the hospital. In addition, because of advanced age (>80 years) some patients were excluded from the HIPEC procedure. This could explain why we did not observe recurrence in group-1 patients. The current study should thus be expanded to other reference centers to validate BFV as a biomarker of disease activity, particularly in combination with MRI. Doppler-US offers a quantitative evaluation of SMA BFV. Although the technique is known to be operator-dependent, the application of strict procedural measurement protocols reduces inter-observer variation.

In conclusion, our results suggest that post-operative BFV measured in the SMA with Doppler-US helps differentiate aggressive versus slowly progressive PMP in patients who had incomplete surgical resection. This technique may allow the early identification of patients who may benefit from post-operative chemotherapy and those who have achieved full benefit from therapy (CRS ± HIPEC). Moreover, we found that pre-operative BFV correlates with surgical PCI and might be helpful to predict resectability. Assessment of BFV in the SMA may thus serve as a quantitative biomarker that adds functional information to diagnostic morphological techniques. Doppler-US imaging is a widely accessible, cheap, easy-to-repeat and non-invasive modality that could allow functional evaluation of tumor progression to be included in future decision algorithms and scoring systems. Our study is the first to report measurement of the BFV in the SAM to follow the progression of a peritoneal disease. This study represents the necessary pilot study to establish the proof of concept but needs further validation by multicenter clinical trial.

Conflict of interest statement

The authors have no potential conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

We thank 1) the AMARAPE patient group for supporting the idea and the project of Blood Flow Velocity measurement (AMARAPE helps for funding and encouragement), 2) Drs Neeraj Dhaun and Eric Camerer for English language editing.

References

- Smeenk RM, van Velthuysen ML, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Appendiceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei: a population based study. *Eur J Surg Oncol* 2008;**34**:196–201.
- Bevan KE, Mohamed F, Moran BJ. Pseudomyxoma peritonei. *World J Gastrointest Oncol* 2010;**2**:44–50.
- Sugarbaker PH. New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome? *Lancet Oncol* 2006;**7**:69–76.
- Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996;**82**:359–74.
- Carr NJ, Finch J, Ilesley IC, et al. Pathology and prognosis in pseudomyxoma peritonei: a review of 274 cases. *J Clin Pathol* 2012;**65**:919–23.
- Kusamura S, Baratti D, Hutanu I, et al. The role of baseline inflammatory-based scores and serum tumor markers to risk stratify pseudomyxoma peritonei patients treated with cytoreduction (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Eur J Surg Oncol* 2015;**41**:1097–105.
- Chen CF, Huang CJ, Kang WY, Hsieh JS. Experience with adjuvant chemotherapy for pseudomyxoma peritonei secondary to mucinous adenocarcinoma of the appendix with oxaliplatin/fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4). *World J Surg Oncol* 2008;**6**:118.
- Sun WL, Hutarew G, Gratl J, Gratzl M, Denz H, Fiegl M. Successful antiangiogenic combination therapy for pseudomyxoma peritonei with bevacizumab and capecitabine. *Cancer Biol Ther* 2009;**8**:1459–62.
- Miner TJ, Shia J, Jaques DP, Klimstra DS, Brennan MF, Coit DG. Long-term survival following treatment of pseudomyxoma peritonei: an analysis of surgical therapy. *Ann Surg* 2005;**241**:300–8.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;**45**:228–47.
- Bonnin P, Coelho J, Pocard M, Levy BI, Marteau P. Anti-TNFalpha therapy early improves hemodynamics in local intestinal and extraintestinal circulations in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:451–9.
- Vincent F, Bonnin P, Clemessy M, et al. Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* 2009;**69**:2853–60.
- Barral M, Raballand A, Dohan A, Soyer P, Pocard M, Bonnin P. Pre-clinical assessment of the efficacy of anti-angiogenic therapies in hepatocellular carcinoma. *Ultrasound Med Biol* 2016;**42**:438–46.
- Bonnin P, Villemain A, Vincent F, et al. Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. *Ultrasound Med Biol* 2007;**33**:561–70.
- Berge M, Allanic D, Bonnin P, et al. Neupilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling. *J Hepatol* 2011;**55**:866–75.
- Dohan A, Lousquy R, Eveno C, et al. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: an in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. *Am J Pathol* 2014;**184**:1920–9.
- Sugarbaker PH, Jablonski KA. Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg* 1995;**221**:124–32.
- British Standards Institution. *Precision of test method (BS5497, part 1)*. London: BSI; 1979.
- Marieb E, Hoehn K. Human anatomy and physiology. In: Pearson Education I, editor. *Cardiovascular system: blood vessels*. 9th ed. 2014. p. 849–80.
- Passot G, Glehen O, Pellet O, et al. Pseudomyxoma peritonei: role of 18F-FDG PET in preoperative evaluation of pathological grade and potential for complete cytoreduction. *Eur J Surg Oncol* 2010;**36**:315–23.
- Low RN, Barone RM, Gurney JM, Muller WD. Mucinous appendiceal neoplasms: preoperative MR staging and classification compared with surgical and histopathologic findings. *AJR Am J Roentgenol* 2008;**190**:656–65.
- Nummela P, Leinonen H, Jarvinen P, et al. Expression of CEA, CA19-9, CA125, and EpCAM in pseudomyxoma peritonei. *Hum Pathol* 2016;**54**:47–54.
- Low RN, Barone RM, Lee MJ. Surveillance MR imaging is superior to serum tumor markers for detecting early tumor recurrence in patients with appendiceal cancer treated with surgical cytoreduction and HIPEC. *Ann Surg Oncol* 2013;**20**:1074–81.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Surgical Oncology

journal homepage: www.ejso.com

Post-operative wall shear stress in the superior mesenteric artery: Biomarker of long term outcome in patients with residual disease after incomplete cytoreductive surgery for pseudomyxoma peritonei

Matthias Barral^{a, b}, Imane El Sanharawi^{a, b, c}, Clarisse Eveno^{a, b, d}, Anthony Dohan^{a, b}, Jean-Marie Launay^e, Réa Lo Dico^{b, d}, Marc Pocard^{a, b, d}, Philippe Bonnin^{a, b, c, *}

^a Sorbonne Paris Cité, Université Paris7 Denis Diderot, Paris, France

^b CART, INSERM UMR965, Hôpital Lariboisière, F-75010, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Lariboisière, Physiologie Clinique – Explorations Fonctionnelles, F-75010, Paris, France

^d AP-HP, Hôpital Lariboisière, Chirurgie Digestive et Cancérologique, F-75010, Paris, France

^e INSERM UMR942, Hôpital Lariboisière, F-75010, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2018

Received in revised form

19 February 2019

Accepted 1 March 2019

Available online xxx

Keywords:

Wall shear stress

Blood flow volume

Blood flow velocity

Superior mesenteric artery

Pseudomyxoma peritonei

ABSTRACT

Background: After incomplete cytoreductive surgery (CRS), the assessment of pseudomyxoma peritonei (PMP) progression remains challenging. The objective was to assess the efficacy of wall shear stress (WSS) measured in superior mesenteric artery (SMA) to predict PMP progression in the postoperative setting to propose additional treatments.

Methods: In a prospective study, 52 patients with PMP had Doppler-ultrasound examination of the SMA with WSS calculation within one year after CRS with a mean follow-up of 43.3 ± 18.3 months. Patients were categorized according to the completeness of CRS and clinical outcome: Group-1 (n = 19): complete CRS and no recurrence, group-2 (n = 20): incomplete CRS with slowly progressive disease (alive at 2 years without severe clinical symptoms), group-3 (n = 13): incomplete CRS and severe clinical symptoms or dead within two years. Results of WSS were compared between groups and to 24 healthy subjects.

Results: WSS measured in the SMA was superior in Group-3 (19.6 ± 8.2 dynes/cm²) than in Group-2 (9.2 ± 1.8 dynes/cm², $p = 1.10^{-6}$), Group-1 (10.4 ± 2.8 dynes/cm², $p = 8.10^{-5}$), and healthy patients (8.7 ± 2.8 dynes/cm², $p = 9.10^{-7}$). One year after surgery, among patients with incomplete CRS a cut-off value of 12.1 dynes/cm² allowed distinguishing patients without from those with severe disease progression with a sensitivity of 100% and a specificity of 100% ($p < 1.10^{-4}$) AUC = 1.000 [95%CI: 0.897–1.000].

Conclusion: Post-operative assessment of the WSS in the SMA in patients with incomplete CRS for PMP should be considered as biomarker of tumor progression in the postoperative setting. Therefore, WSS could be useful to target patients needing adjuvant systemic chemotherapy one year after CRS.

© 2019 Elsevier Ltd, BASO – The Association for Cancer Surgery, and the European Society of Surgical Oncology. All rights reserved.

Introduction

Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare peritoneal tumor characterized by intra-abdominal mucinous ascites with a low cellularity but a sustained tumor angiogenesis [1–3]. Thus, PMP is responsible of a consistent and permanent increase of the blood

flow volume (BFVol) and blood flow velocity (BFVel) in the superior mesenteric artery (SMA) [4,5]. Curative treatment combines complete cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) [6]. In case of incomplete CRS with macroscopic residual disease, treatment strategy is debated. Some patients have an aggressive disease with early recurrence of symptoms including abdominal pain and malnutrition, and should require systemic treatment. Other patients experience a non-progressive disease with a good quality of life and limited symptoms that are managed with a “wait and see” strategy. In our practice, we propose a systemic chemotherapy in case of high grade

* Corresponding author. Physiologie Clinique – Explorations Fonctionnelles, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, F-75475, Paris CEDEX10, France.
E-mail address: philippe.bonnin@aphp.fr (P. Bonnin).

<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.03.001>

0748-7983/© 2019 Elsevier Ltd, BASO – The Association for Cancer Surgery, and the European Society of Surgical Oncology. All rights reserved.

Please cite this article as: Barral M et al., Post-operative wall shear stress in the superior mesenteric artery: Biomarker of long term outcome in patients with residual disease after incomplete cytoreductive surgery for pseudomyxoma peritonei, European Journal of Surgical Oncology, <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.03.001>

PMP, if recurrence, and, conversely, a “watchful waiting” strategy in case of low grade PMP even if extended residual disease with altered general status. To the best of our knowledge, no prognosis factor is effective and disease progression remains difficult to predict [1,2]. Thus, predictive factors are urgently needed in order to propose a personalized strategy, adapted to the patient and to the disease.

It has been demonstrated that tumor angiogenesis results in a drop in vascular impedance and induces strong upstream hemodynamic modifications [4,5,7,8]. Consequently, changes in BFVol and BFVel in the SMA have been previously suggested as a biomarker of disease progression in PMP [4,5]. In patients with PMP, it has been demonstrated that BFVol measured in the SMA one year after surgery is able to predict tumor progression [4].

Increases in metabolic needs result in a transient increase of the BFVol, BFVel and wall shear stress (WSS) that stimulates endothelium derived nitric oxide (NO) production [9]. As it happens in the native conduit artery supplying an organ with permanent augmentation of the metabolic needs, the continuous up-regulation of the endothelial NO synthase is responsible for long-term structural arterial remodeling [10,11]. This arterial remodeling consists in permanent arterial diameter enlargement, wall thickening, and fibrosis [10,12–14]. More precisely, arterial remodeling aims to reestablish baseline mechanical conditions, particularly the WSS [15–17].

Here, we hypothesized that microvascular angiogenesis in PMP exposes the SMA to continuous elevated BFVol, BFVels and WSS which could consecutively initiate arterial remodeling. It has been demonstrated even in atherosclerosis and hypertension that arterial remodeling evolves over a relatively long time-course (over few months in humans) [18]. Periods of growth of the PMP vascular network would lead to lasting elevated BFVols and submit the feeding arteries to transient periods of arterial remodeling. Thus, imbalance between arterial inflow and downstream microvascular network expansion would result in increased WSS. Conversely, during periods of stability or PMP remission, achievement of

arterial remodeling processes with SMA inner diameter enlargement would lead to the normalization of the BFVel and WSS although BFVol remains elevated.

WSS measured in the afferent arteries of superficial arteriovenous malformations (sAVM) has been previously demonstrated as a simple reliable criterion to distinguish progressive from stable sAVM. WSS should be considered to monitor patients with facial sAVM and to guide the therapeutic strategy [19]. The objective of this study was to assess the efficacy of WSS measured in the SMA using Doppler ultrasound to predict PMP progression in the post-operative setting.

Patients and methods

The institutional review board (IRB) approved the study (ID GRIVIL 09-11-016), all patients gave their informed consent. All patients had a peritoneal exploration and determination of the peritoneal carcinomatosis index (PCI) during a CRS. The completeness of CRS determined the decision to perform HIPEC [20–24]. All patients had a pathological analysis with an evaluation of the tumor grade according to the WHO classification [1]. Doppler ultrasound was performed in the SMA 16.3 ± 5.7 months [min-max: 7.6–24.8 months] after CRS (\pm HIPEC), with a mean follow-up of 43.3 ± 18.3 months [min-max: 9.6–53.9 months] after surgery. All patients had serum tumor markers measurements of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) at the same time of Doppler Ultrasound. The use of post-operative systemic chemotherapy or bevacizumab was noticed in Table 1; this use was not driven by the Doppler ultrasound findings and the clinical practitioner or the surgeon was blind of these findings.

Patients were distributed into 3 groups according to their clinical outcome. Completeness of resection was graded according to Sugarbaker's complete cytoreduction (CCR) score as follows: CCR0: no residual tumor; CCR1: residual tumor < 0.25 cm; CCR2: residual tumor between 0.25 and 2.5 cm; CCR3: residual tumor > 2.5 cm

Table 1
Patients' characteristics.

	Controls (n = 24)	Group-1 (CCR0-1, stable) (n = 19)	Group-2 (CCR2-3, stable) (n = 20)	Group-3 (CCR2-3, progression) (n = 13)	χ^2 test p value	One-way ANOVA (between Cont., G1, G2, G3 or between G1, G2, G3)
Age (years)						
Mean	43	57	64 *	65 **		p < 0.001
(SD)	(13)	(14)	(8)	(12)		
[range]	[22–69]	[33–78]	[52–73]	[46–87]		
Gender [Patients (n)]						
Women	10	13	3	9	0.091	–
Men	14	6	17	3		
PCI [Patients (n)]						
Mean	–	18	35 †	29		0.002
(SD)	–	9	5	4		
[range]	–	[1–27]	[30–39]	[24–36]		
Grade [Patients (n)]						
Low	–	16	6	7	0.182	–
High	–	3	2	6		
Delay between diagnosis and surgery (years)						
Mean	–	3.1	1.0	1.4		0.291
(SD)	–	(4.6)	(1.4)	(1.5)		
[range]	–	[0.1–10.1]	[0.2–4.2]	[0.1–3.3]		
Post-operative chemo therapy [Patients (n)]						
yes	–	0	2	2	0.088	–
no	–	0	0	0		
Post-operative bevacizumab [Patients (n)]						
yes	–	0	1	1	0.516	–
no	–	0	0	0		

Note. SD standard deviation, PCI Peritoneal Cancer Index at surgery, CCR complete cytoreduction score; *p < 0.005, **p < 0.001: vs controls; †p < 0.005: vs group-1; –: NA.

[23]. Group-1 (n = 19): patients with complete resection (CCR0) and HIPEC without any recurrence within three years after surgery; Group-2 (n = 20): patients with incomplete resection (CCR1, CCR2 or CCR3 score) and slowly progressive disease: alive 3 years after surgery or at last during follow-up without progression of the disease (i.e. progression-free). Group-3 (n = 13) included patients with incomplete resection (CCR1, CCR2 or CCR3 score) with active progressive disease. Progression was defined as follows: clinically, patients with active progression had performance status >1 or were dead related to the disease within 3 years after surgery, whereas patients with slow progression were alive 3 years after surgery or at last during follow-up without progression of the disease (i.e. progression-free) with a performance status ≤1. Carcinoembryonic antigen or carbohydrate antigen 19-9 elevation was considered as biological criteria of progression or recurrence. The onset of new mucinous deposit on cross-sectional imaging (magnetic resonance imaging or computed tomography) within 6 months was considered as a recurrence or active progression. Patients' characteristics are reported in Table 1. The cohort of patients was partly previously described in a study aiming to determine the modifications of the BFVols in the SMA (30/52 patients; 57%) [4].

Doppler Ultrasound

Ultrasonographers were blind to past history, clinical and radiological examinations of all patients and inversely the clinical practitioner or the surgeon and the radiologist were blind from the results of the Doppler Ultrasound.

Method of measurement of Doppler ultrasound values have been previously published [4,7,8,25]. Briefly, Doppler-US was performed after an overnight fast at rest in patients in semi-seating or seating position to minimize the gas interposition between the US probe and the SMA. SMA inner diameter measurements were performed using M-mode with an echograph ACUSON S2000 (Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a curvilinear transducer type CH4-1 (3.5 MHz). Spatial-average-time-average (Mean-BFVel) velocity was measured from the spectral analysis of the Doppler blood flow velocity waveforms. The Mean-BFVel is the computed-derived value calculated by integrating the area under instantaneous mean velocity. Indeed, blood flow velocity profile is parabolic in peripheral vessels, thus total displacement of blood is represented by the displacement of all the layers of blood on the arterial section. The Mean-BFVel is representative of the blood displacement over the whole arterial section and per time's unit.

BFVol must be calculated with Mean-BFVel following the formula:

$$\text{BFVol} = \pi \cdot r^2 \cdot \text{Mean-BFVel} \cdot 60$$

where BFVol is the blood volume in mL/min, Mean-BFVel is the spatial-averaged-time-averaged mean blood flow velocity in cm/s, and r the radius of the artery in cm. Each measurement was taken in triplicate during quiet respiration and averaged.

Wall Shear stress is calculated following the formula:

$$\tau = 4 \cdot \mu \cdot \text{BFVol} / \pi \cdot r^3 \text{ or } \tau = 8 \cdot \mu \cdot \text{Mean-BFVel} / d$$

where τ is the WSS in dynes/cm², μ is the blood viscosity in poise (P), mean BFVel is the spatial-averaged-time-averaged BFVel (cm/s), d is the diameter (cm). In conduit arteries, blood acts like a Newtonian fluid and a value of 0.035 P for viscosity can be used to calculate the WSS; normal value for WSS ranges around 8–10 in conduit arteries to 50 dynes/cm² in the arterioles [26]. Doppler ultrasound was considered as representative of vascular network modifications of the disease only if performed during the previous

6 months before disease progression. Healthy adults (n = 24) were enrolled as controls.

Previously to this work, the repeatability of measurements was investigated in 24 control subjects for intra-observer and in 10 controls for inter-observer repeatability. In each case, two series of paired measurements (mBFVelocities and WSS) separated by a 30 min interval were recorded by one experienced and two new trained (6 months) practitioners used to explore sAVM patients. The repeatability coefficient (RC) was calculated as defined by the British Standard Institution [27], i.e. according to the formula $RC^2 = \sum Di^2 / N$, where Di is the relative (positive or negative) differences within each pair of measures, N the sample. This coefficient is the standard deviation of the estimated difference between two repeated measurements. The intra-observer RC values were 1.5 cm/s for the mBFVels and 0.02 mm for the SMA inner diameter. The inter-observer RC values were 1.7 cm/s and 0.03 mm respectively for the mBFVels and the SMA inner diameter. All differences exhibited by the different parameters between the different groups of patients were largely superior to their corresponding RC values.

Great care must be taken into the choice of the US Doppler device used for mean blood flow velocities measurements. Some devices calculate the mBFVelocity from raw data with accuracy, others from post-treatment analysis of the recorded spectral Doppler waveforms with unacceptable variations due to the level of setting of the trace sensitivity.

Statistics

Continuous variables are reported as mean ± standard-deviation (SD), and range: [min-max]. The Gaussian distribution of the continuous variables was assessed using the D'Agostino-Pearson test, particularly the WSS values in all patients' groups. Categorical data were analyzed using the Chi-squared test when appropriate. Continuous variables (arterial diameters, BFVel, BFVol and WSS) were analyzed with a one-way ANOVA according to the score of surgery (CCR0 or CCR1-3) and stability or recurrence/progression of the disease. In both cases, when ANOVA was significant, differences between groups were evaluated with post-hoc Student-Newman-Keuls and unpaired Student t-test. In all case, power of the tests were verified and considered as significant when >80% (<http://www.anastats.fr>, ANASTATS, Rilly Sur Vienne, France) [28].

A receiver operating characteristics (ROC) curve of Doppler measurements was built and cut-off values were calculated to discriminate: between patients who had severe active progressive disease (Group-3) from those with slowly progressive disease (Group-2). Sensitivity, specificity and areas under curves (AUC) with their 95% confidence intervals (95%CI) were calculated. Cut-off for WSS values was computed. (MedCalc® Statistical Software version 18.2.1, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Only P values < 0.05 were considered significant [29].

Results

Results of Doppler ultrasound findings are reported in Table 2.

BFVol was increased in patients with residual PMP one year after CRS in Group-2 and -3 due to the presence of a downstream abnormal vascular network and to the increase in metabolic demand. BFVol was higher in Group-3 (615 ± 194 mL/min) than in Group-2 (414 ± 161 mL/min, $p = 2.6 \cdot 10^{-3}$), Group-1 (270 ± 107 mL/min, $p = 3 \cdot 10^{-7}$) and healthy volunteers (232 ± 50 mL/min, $p = 9 \cdot 10^{-11}$). BFVol was higher in Group-2 than in Group-1 ($p = 1.2 \cdot 10^{-3}$) and healthy volunteers ($p = 2 \cdot 10^{-6}$, Fig. 1A). One year after surgery, among patients with incomplete CRS a cut-off value of 433 mL/min allowed to distinguish patients without from those with severe disease progression with a sensitivity of 83.3%

Table 2
Doppler ultrasonography and laboratory findings.

	Controls (n = 24)	Group-1 CCR0 stable (n = 19)	Group-2 CCR1-3 stable (n = 20)	Group-3 CCR1-3, progression (n = 13)	One-way ANOVA (between Cont., G1, G2, G3 or between G1, G2, G3)
SMA Diameter (cm)					
Mean	0.54	0.53	0.64 ** ††	0.57 #	p < 0.001
(SD)	(0.06)	(0.09)	(0.06)	(0.08)	
[range]	[0.41–0.66]	[0.41–0.66]	[0.49–0.76]	[0.49–0.72]	
SMA BFVel (cm/s)					
Mean	16.9	19.3	20.7	38.6 ** †† ##	p < 0.001
(SD)	(4.8)	(4.1)	(4.9)	(13.3)	
[range]	[9.5–25.6]	[9.9–24.2]	[8.5–29.2]	[22.7–65.9]	
SMA BFVol (mL/min)					
Mean	232	270	414 **	615** † #	p < 0.001
(SD)	(50)	(107)	(161)	(194)	
[range]	[125–309]	[150–474]	[165–763]	[375–1035]	
SMA WSS (dynes/cm²)					
Mean	8.7	10.4	9.2	19.6 ** †† ##	p < 0.001
(SD)	(2.8)	(2.8)	(1.8)	(8.2)	
[range]	[5.0–13.3]	[4.3–16.5]	[5.7–12.1]	[12.4–37.4]	
Delay Surgery/Doppler-US (years)					
Mean	–	1.2	1.3	1.4	p = 0.448
(SD)	–	(0.5)	(0.5)	(0.7)	
[range]	–	[0.6–2.0]	[0.7–2.0]	[0.7–2.8]	
Delay Surgery/recurrence or progression (years)					
Mean	–	–	–	1.6	–
(SD)	–	–	–	(1.2)	
[range]	–	–	–	[0.6–3.9]	
Time delay of follow-up after surgery (years)					
Mean	–	4.5	2.8	2.4 *	p = 0.003
(SD)	–	(1.5)	(1.0)	(1.2)	
[range]	–	[1.1–6.6]	[0.8–3.8]	[1.1–4.5]	
CEA (µg/l)					
Mean	–	5.0	52.6	93.9	p = 0.199
(SD)	–	(5.5)	(113.5)	(162.1)	
[range]	–	[0.5–17.0]	[2.4–450.0]	[4.0–600.0]	
CA19-9 (µg/l)					
Mean	–	7.6	370.5	341.3	p = 0.268
(SD)	–	(5.3)	(3054.0)	(300.6)	
[range]	–	[2.0–20.0]	[0.6–3054.0]	[0.6–900.0]	

Note. SD standard deviation, SMA superior mesenteric artery, BFVel mean blood flow velocity, BFVol blood flow volume, WSS wall shear stress, CEA carcinoembryonic antigen, **p < 0.001: vs controls; †; p < 0.005, ††; p < 0.001: CCR0 vs CCR1-3, #p < 0.005, ##p < 0.001: group-3 vs group-2.

and a specificity of 66.7%, ($p = 5.10^{-4}$), AUC = 0.782 [95%CI: 0.604–0.906].

SMA inner diameter was adapted only in Group-2 to the increased BFVol. SMA inner diameter was superior in Group-2 (0.64 ± 0.06 cm), than in Group-3 (0.57 ± 0.08 , $p = 4.5 \cdot 10^{-3}$), Group-1 (0.53 ± 0.09 , $p = 6.10^{-5}$) and healthy volunteer (0.54 ± 0.06 cm, $p = 2.10^{-6}$). No difference was seen between SMA inner diameter of Group-3, Group-1 and healthy volunteers (Fig. 1B). One year after surgery, among patients with incomplete CRS a cut-off value of 0.58 cm allowed the distinction of patients without from those with severe disease progression with a sensitivity of 61.5% and a specificity of 90.5% ($p = 1.1 \cdot 10^{-3}$) AUC = 0.787 [95%CI: 0.610–0.906].

BFVel was increased only in patients with progressive residual PMP after CRS (Group-3). BFVel was higher in Group-3 (38.6 ± 13.3 cm/s) than in Group-2 (20.7 ± 4.9 cm/s, $p = 1.10^{-6}$), Group-1 (19.3 ± 4.1 cm/s, $p = 2.10^{-6}$) and healthy volunteers (16.9 ± 4.8 cm/s, $p = 2.10^{-8}$). BFVel was similar between Group-2, Group-1 and healthy volunteers (Fig. 1C). One year after surgery, among patients with incomplete CRS a cut-off value of 25.0 cm/s allowed the distinction of patients without from those with severe disease progression with a sensitivity of 92.3% and a specificity of 85.7% ($p < 1.10^{-4}$) AUC = 0.945 [95%CI: 0.809–0.994].

WSS was increased only in patients with progressive residual PMP after CRS (Group-3). WSS measured in the SMA was superior in Group-3 (19.6 ± 8.2 dynes/cm²) than in Group-2 (9.2 ± 1.8 dynes/cm², $p = 1.10^{-6}$), Group-1 (10.4 ± 2.8 dynes/cm², $p = 8.10^{-5}$), and

healthy patients (8.7 ± 2.8 dynes/cm², $p = 9.10^{-7}$). No difference was seen in WSS measured in the SMA between Group-2, Group-1 and healthy volunteers (Fig. 1D). One year after surgery, among patients with incomplete CRS a cut-off value of 12.1 dynes/cm² allowed the distinction of patients without from those with severe disease progression with a sensitivity of 100% and a specificity of 100% ($p < 1.10^{-4}$) AUC = 1.000 [95%CI: 0.897–1.000] (absence of superposition of the data distribution of stable patients versus patients with progressive disease).

Pathological grade of the disease, CEA and CA19-9, and the use of systemic chemotherapy were similar between groups. Results of laboratory findings are reported in Table 2.

Discussion

The results of this study demonstrate that after CRS for PMP, WSS >12.1 dynes/cm² in the SMA is associated with a worse outcome among patients with residual disease. Consequently, upstream WSSs' increase reflects an ongoing expansive arterial remodeling, consecutive to the ongoing expansion of the pathological vascular network. On the other hand, delayed achievement of arterial remodeling corresponding to a normalized WSS could reflect the stability of PMP whatever the level of the BFVol. Moreover, the use of WSS is more accurate and sensitive than the use of BFVol, BFVel or SMA inner diameter for prediction of clinical outcome at one-year after CRS.

Patients without residual disease or slow progressive disease

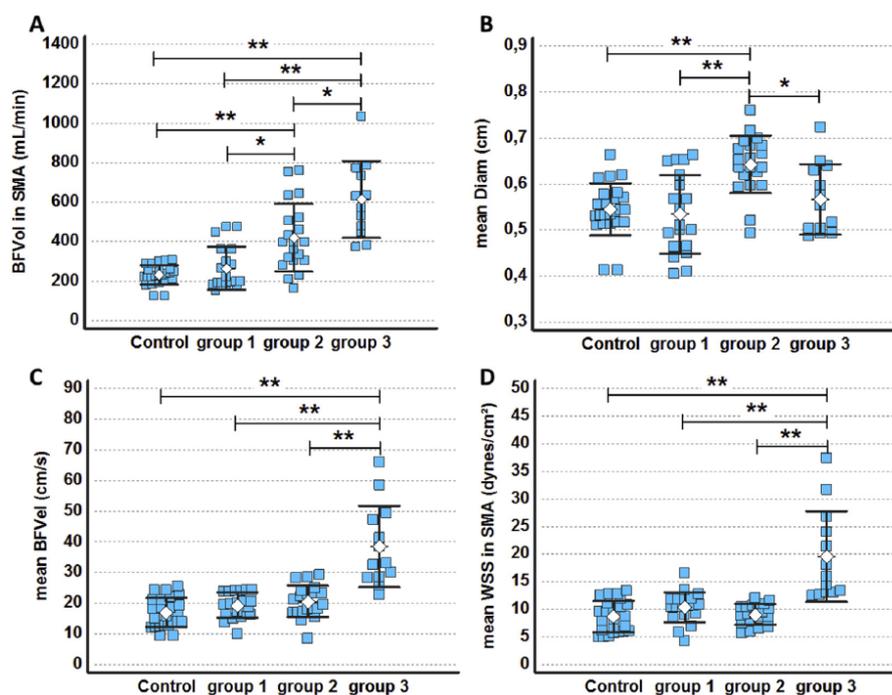


Fig. 1. Doppler Ultrasound findings in the superior mesenteric artery (SMA) in patients with a pseudomyxoma peritonei (PMP) one year after cytoreductive surgery. Group-1: patients with complete resection (CCR0) and HIPEC without any recurrence, Group-2: patients with incomplete eradication of the disease (CCR1, -2, -3) and slowly progressive disease, Group-3: patients with incomplete eradication of the disease (CCR1, -2, -3) and active progressive residual PMP. (A), blood flow volume (BFVol) in the superior mesenteric artery; (B), superior mesenteric artery inner diameter; (C), mean blood flow velocity (BFVel) in the superior mesenteric artery; (D), wall shear stress (WSS) in the superior mesenteric artery. (*: $p < 0.005$, **: $p < 0.001$ between groups).

after surgery showed normal WSS compared to controls. More precisely, in Group-1, patients with total ablation of the PMP abnormal vascular network had BFVols, SMA inner diameters, BFVels and WSSs similar to that of healthy subjects. Only 9/19 Group-1 patients had a Doppler ultrasound examination before surgery. In these 9 patients, values after vs before CRS+HIPEC were respectively: 214 ± 46 vs 390 ± 127 mL/min ($p = 0.0012$), 0.51 ± 0.05 vs 0.59 ± 0.05 mm ($p = 0.0049$), 17.3 ± 1.8 vs 24.3 ± 6.1 cm/s ($p = 0.0074$) and 9.6 ± 1.6 vs 11.5 ± 2.8 dynes/cm² ($p = 0.1126$). The normalization of the SMA hemodynamic values suggests an achieved regressive arterial remodeling with adjustment (decrease) of the arterial lumen diameter to the decreased BFVol for normalization of the BFVel and the WSS in physiological ranges. This was illustrative of a recovered balance between a stable and normalized downstream vascular network and the upstream SMA hemodynamics. Similar findings were also observed in the afferent arteries which supplied superficial arteriovenous malformations after total resection of the nidus [19]. On the other hand, in Group-2, incomplete ablation of the PMP abnormal vascular network, without progression entailed a stable elevation of the BFVol in the SMA. This elevation resulted in an expansive arterial remodeling responsible of an increase in the SMA inner diameter inducing the normalization of the WSS illustrative of a recovered balance between a persistent but stable downstream tumor and native vascular network and the upstream SMA hemodynamics. These two opposite adaptive response reflected the achievement of the arterial remodeling processes over few months.

Conversely in Group-3, incomplete ablation of the PMP

abnormal vascular network, with progression of the disease, i.e. with progressive extension of the downstream microvascular network, is associated with a persistent and continuously rising BFVol without sufficient SMA inner diameter enlargement leading to an elevated WSS. This is suggestive of a persistent imbalance between the growing downstream tumor vascular network and the upstream SMA hemodynamics thus of an ongoing vascular remodeling. In addition, these group-3 patients presented as high WSSs as long as the time between the US Doppler examination and the recurrence diagnosed by the surgeon based on the semi-annual clinical/radiological examinations (delayed arterial remodeling). The extended distribution of the WSSs values can be explained by the variable delay between the US Doppler examination and the recurrence of the disease (7.2 ± 3.0 months). More precisely, group-3 patients had US Doppler examination from 1 month to 1 year before the recurrence. Nevertheless, WSSs were higher in all group-3 patients and could represent a predictive marker of progression of the PMP tumor vascular network obviously parallel to the progression of the disease whatever the unforeseeable time-delay between the US Doppler examination and the recurrence.

Arterial remodeling requires coordinated changes in cellular proliferation, apoptosis, migration, cell organization, and matrix-integrin interactions throughout the layered structure of the vessel. The association of blood flow with arterial remodeling has been studied in various experimental techniques and conditions. In this regard, one of the most comprehensive models to investigate small artery response was developed by Jo de Mey [30]. Persistent

changes in blood flow were induced in juvenile rats by ligating every first-order side branch of the SMA [31]. Patent arteries were exposed to high flow (roughly twice that normally observed), while occluded mesenteric arteries had practically no blood flow. This chronic low flow resulted in decreased passive lumen diameter, hypotrophy of the arterial wall, and both loss and atrophy of smooth muscle cells. On the contrary, high flow led to increased lumen diameter and arterial wall hypertrophy. Similarly, in the rabbit, Tronc et al. evidenced the enlargement of the common carotid artery after creation of an arteriovenous fistula between the common carotid artery and the jugular vein [32].

Plasma or tissue tumor markers have been suggested as prognosis factors to monitor treatment response and to detect tumor recurrence in gastrointestinal tumors [33]. In PMP patients, it has been shown a reduction or normalization of CEA, and in less measure of CA 19.9 and CA 125, after CRS [34]. However, it is admitted that treatment decisions should not be based solely on an increased CAE or CA 19-9 [33,34]. In our study, both tumor markers did not reach the statistical significant level because of the wide distribution of the individual values. Dohan et al. reported that post-operative BFVols after incomplete surgery in patients with PMP, might aid in identifying patients who may benefit of post-operative therapy [4]. More precisely, they reported that BFVol was superior in patients with incomplete CRS and active progressive disease than in patients with slow progressive disease. In addition they found that a cut-off of 530 mL/min could discriminate between slow progressive disease and active progressive disease with a sensitivity of 80% and a specificity of 93%. In our study, patients with incomplete CRS and progressive disease had a mean BFVol of 615 ± 194 mL/min, and the cut-off value was established at to 432 mL/min with a sensitivity of 83.3% and a specificity of 65.0%, consistent with their result. However, WSS demonstrated higher performances with sensitivity and specificity of 100%. In addition, our study has a greater sample of post-operative patients with 52 patients versus 30 patients in their study. The time of US examination was enlarged (16.2 ± 6.4 months) and reflects the heterogeneity of origin of our patients. Indeed, as a reference centre our institution treats remote and foreign patients for whom the combination of all imaging examinations along with the biannual surgical appointments for follow-up may be difficult. However, we recommend that imaging examinations should be performed at 6 months and one year after surgery, then every year.

In conclusion, an elevated WSS measured in the SMA of patients with PMP after CRS is associated with disease progression. Moreover, patients with residual disease after CRS and a $WSS > 12.1$ dyn/cm² in the SMA have a poorer outcome. WSS measurement in the SMA of patients with PMP after CRS should be considered as biomarker of tumor progression.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author.

Acknowledgments

We gratefully thank the AMARAPE patient group for supporting the idea and the project of Blood Flow Velocity measurement.

References

- [1] Carr NJ, Finch J, Ilesley IC, Chandrakumaran K, Mohamed F, Mirnezami A, et al. Pathology and prognosis in pseudomyxoma peritonei: a review of 274 cases. *J Clin Pathol* 2012;65:919–23. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200843>.
- [2] Sun W-L, Hutarew G, Gradl J, Gratzl M, Denz H, Fiegl M. Successful anti-angiogenic combination therapy for pseudomyxoma peritonei with bevacizumab and capecitabine. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1459–62.
- [3] Smeenk RM, van Velthuisen MLF, Verwaal VJ, Zoetmulder F a N. Appendiceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei: a population based study. *Eur J Surg Oncol* 2008;34:196–201. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2007.04.002>.
- [4] Dohan A, Barral M, Eveno C, Lo Dico R, Kaci R, Pasteur-Rousseau A, et al. Prediction of clinical outcome using blood flow volume in the superior mesenteric artery in patients with pseudomyxoma peritonei treated by cytoreductive surgery. *Eur J Surg Oncol* 2017;43:1932–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.05.015>.
- [5] Dohan A, Lousquy R, Eveno C, Goere D, Broqueres-You D, Kaci R, et al. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: an in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. *Am J Pathol* 2014;184. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.03.004>.
- [6] Ansari N, Chandrakumaran K, Dayal S, Mohamed F, Cecil TD, Moran BJ. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in 1000 patients with perforated appendiceal epithelial tumours. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:1035–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.03.017>.
- [7] Barral M, Raballand A, Dohan A, Soyer P, Pocard M, Bonnin P. Preclinical assessment of the efficacy of anti-angiogenic therapies in hepatocellular carcinoma. *Ultrasound Med Biol* 2016;42:438–46. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2015.10.012>.
- [8] Eveno C, Le Henaff C, Audollet R, Soyer P, Rampanou A, Nemeth J, et al. Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:1195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.03.004>.
- [9] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–6.
- [10] Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E120–6.
- [11] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998;101:731–6. <https://doi.org/10.1172/JCI1699>.
- [12] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995;75:519–60. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.519>.
- [13] Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel JB. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 1997;272:H851–8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.2.H851>.
- [14] Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980;239:H14–21. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1980.239.1.H14>.
- [15] Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986;231:405–7.
- [16] Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 2006;259:381–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x>.
- [17] Lehoux S, Lévy BI. Collateral artery growth: making the most of what you have. *Circ Res* 2006;99:567–9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000243585.97392.95>.
- [18] Kubis N, Checoury A, Tedgui A, Lévy BI. Adaptive common carotid arteries remodeling after unilateral internal carotid artery occlusion in adult patients. *Cardiovasc Res* 2001;50:597–602.
- [19] El Sanharawi I, Barral M, Lenk S, Dillinger JG, Salvan D, Mangin G, et al. Wall shear stress in the feeding native conduit arteries of superficial arteriovenous malformations of the lower face is a reliable marker of disease progression. *Ultraschall der Med* 2018. <https://doi.org/10.1055/a-0729-2728>.
- [20] Sugarbaker PH, Chang D. Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy. *Ann Surg Oncol* 1999;6:727–31.
- [21] Sugarbaker PH, Ryan DP. Cytoreductive surgery plus hyperthermic perioperative chemotherapy to treat peritoneal metastases from colorectal cancer: standard of care or an experimental approach? *Lancet Oncol* 2012;13:e362–9. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70210-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70210-3).
- [22] Sugarbaker PH, Ryan DP. Cytoreductive surgery plus hyperthermic perioperative chemotherapy to treat peritoneal metastases from colorectal cancer: standard of care or an experimental approach? *Lancet Oncol* 2012;13:e362–9. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70210-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70210-3).
- [23] Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, Elias D, Levine EA, De Simone M, et al. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* 2004;22:3284–92. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.012>.
- [24] Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996;82:359–74.
- [25] Bonnin P, Coelho J, Pocard M, Levy BI, Marteau P. Anti-TNF α therapy early improves hemodynamics in local intestinal and extraintestinal circulations in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:451–9. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.07.002>.
- [26] Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* 2005;46:9–15.

- [27] British standards institution: precision of test method (BS5497, part 1). London: BSI; 1979.
- [28] Moyé L. Statistical methods for cardiovascular researchers. *Circ Res* 2016;118:439–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306305>.
- [29] Johnson VE. Revised standards for statistical evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:19313–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313476110>.
- [30] Pourageaud F, De Mey JG. Vasomotor responses in chronically hyperperfused and hypoperfused rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1998;274:H1301–7.
- [31] Lemkens P, Nelissen J, Meens MJPM, Fazzi GE, Janssen GJM, Debets JJM, et al. Impaired flow-induced arterial remodeling in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens Res* 2012;35:1093–101. <https://doi.org/10.1038/hr.2012.94>.
- [32] Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1256–62.
- [33] Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, et al. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol* 2010;21:441–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp332>.
- [34] Di Fabio F, Aston W, Mohamed F, Chandrakumaran K, Cecil T, Moran B. Elevated tumour markers are normalized in most patients with pseudomyxoma peritonei 7 days after complete tumour removal. *Colorectal Dis* 2015;17:698–703. <https://doi.org/10.1111/codi.12924>.

3.3 Malformations artérioveineuses cranio-cervico-faciales superficielles (MAVS) chez l'homme

El Sanharawi I, **Barral M**, Lenk S, Dillinger JG, Salvan D, Mangin G, Cogo A, Bailliart O, Levy BI, Kubis N, Bisdorff Bresson A, Bonnin P. Wall shear stress in the feeding native conduit arteries of superficial arteriovenous malformations of the lower face is a reliable marker of disease progression. *Ultraschall in der Medizin* 2018 doi: 10.1055/a-0729-2728.

3.3.1 Introduction

Les MAVS cranio-cervico-faciales sont caractérisées par la présence de multiples communications artérioveineuses centrées dans l'espace dans un « nidus ». Il s'agit d'un modèle intéressant de néoangiogenèse non tumorale qui alterne entre des périodes quiescentes et des périodes d'évolutivité en fonction d'événements externes (traumatismes, chirurgie), internes (imprégnation hormonale lors de la puberté, grossesse) ou spontanément. Le traitement repose soit sur une chirurgie d'exérèse complète, soit sur l'embolisation des vaisseaux du nidus. Toutefois, eu égard à la profondeur, à l'extension et à leur localisation, la chirurgie peut être très délabrante avec un préjudice esthétique important. Quant à une embolisation ou une chirurgie est incomplète, elles peuvent aboutir à une stimulation de la MAVS. Il est donc primordial de bien peser les indications thérapeutiques et parfois de préférer une surveillance active. La décision se fait lors de réunion pluridisciplinaire en centre spécialisé sur des critères d'évolutivité, de localisation, d'extension en profondeur. L'augmentation de volume les rend symptomatiques avec survenue de douleurs, de saignements, d'un effet de masse et surtout d'un préjudice esthétique pouvant devenir important. En revanche, il n'y a aujourd'hui peu de marqueurs biologiques ou morphologiques précoces d'évolutivité.

Aujourd'hui seule la mise en évidence d'une modification lors de la pratique d'exams morphologiques successifs sur plusieurs mois guidés par la clinique renseigne sur la dynamique de la MAVS.

Il y a donc besoin d'un marqueur fonctionnel de l'évolutivité des MAV permettant potentiellement soit de pousser le chirurgien à réséquer totalement une lésion expansive alors qu'elle n'est pas encore trop volumineuse, afin de ne pas défigurer le patient et limiter les chirurgies de reconstruction ; soit au contraire d'indiquer au clinicien la stabilité de la MAVS et d'adopter une attitude plus conservatrice.

L'objectif de ce travail était

1. D'étudier les modifications hémodynamiques en termes de vitesse, de diamètre artériel, de débit et de forces de cisaillement dans les artères afférentes aux MAVS
2. De mettre au point des marqueurs précoces d'évolutivité afin de détecter les formes agressives de MAVS et les récives précoces postopératoires afin de guider l'attitude thérapeutique.

3.3.2 Résultats et conclusions

Cette étude a montré que les modifications ultrasonores du diamètre vasculaire et des vitesses moyennes dans les artères nourricières des patients atteints de MAVS cervico-cranio-faciales superficielles permettent de différencier une MAVS stable d'une MAVS évolutive.

Ce n'est pas la valeur absolue du débit sanguin dans les artères d'amont (proportionnel au volume du nidus) qui permettait de statuer sur l'évolutivité d'une MAVS, mais le

déphasage entre les changements hémodynamiques locaux (nidus) et d'amont (artères natives), mis en évidence par le calcul des forces de cisaillement.

En effet, en l'absence d'évolution de la MAVS, le débit sanguin restait stable dans les artères en amont du nidus et les modifications pariétales artérielles ont le temps de se réaliser pour assurer le remodelage artériel (dilatation) afin de normaliser les forces de cisaillement. Par contre, au cours d'une poussée évolutive de la MAVS, quand le volume du nidus s'accroît graduellement, la dynamique des processus de remodelage artériel sur les artères natives d'amont est « en retard » par rapport à la dynamique d'expansion du nidus. Les grandeurs hémodynamiques sur les artères d'amont sont alors en déséquilibre avec notamment des vitesses circulatoires et des forces de cisaillement élevées, ceci pour assurer l'augmentation de débit sanguin imposé par la MAVS, alors que le remodelage artériel n'était encore pas abouti (absence de dilatation des artères natives qui prend quelques semaines à quelques mois).

Un patient qui aura été opéré de sa MAVS aura des forces de cisaillement et des vitesses normalisées, témoignant d'un phénomène de normalisation pariétale vasculaire, d'un remodelage régressif.

L'échographie Doppler des artères afférentes à la MAVS semble donc un examen intéressant et prédictif pour distinguer, lors du diagnostic et du suivi postopératoire, une MAVS évolutive d'une MAVS stable.

Wall Shear Stress in the Feeding Native Conduit Arteries of Superficial Arteriovenous Malformations of the Lower Face is a Reliable Marker of Disease Progression

Die Wandschubspannung in den zuführenden nativen Arterien ist ein zuverlässiger Marker für den Krankheitsverlauf bei oberflächlichen arteriovenösen Fehlbildungen des unteren Gesichts

Authors

Imane El sanharawi¹, Matthias Barral², Stéphanie Lenck³, Jean Guillaume Dillinger⁴, Didier Salvan⁴, Gabrielle Mangin², Adrien Cogo², Olivier Bailliart¹, Bernard I. Levy⁵, Nathalie Kubis¹, Annouk Bisdorff Bresson³, Philippe Bonnin¹

Affiliations

- 1 APHP, Clinical Physiology – Functional Investigations, Lariboisiere Hospital, Paris, France
- 2 UMR965, CART, INSERM, Lariboisiere Hospital, Paris, France
- 3 APHP, Neuroradiology, center for arteriovenous malformations in children and adults, Lariboisiere Hospital, Paris, France
- 4 APHP, Otorhinolaryngology and maxillofacial surgery, Lariboisiere Hospital, Paris, France
- 5 Lariboisiere Hospital, Vessel and Blood Institut, Paris, France

Key words

arteriovenous malformation, blood flow volume, external carotid artery, facial artery, wall shear stress

received 20.05.2018

accepted 26.08.2018

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0729-2728>

Published online: October 15, 2018

Ultraschall in Med

© Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart · New York

ISSN 0172-4614

Correspondence

Dr. Philippe Bonnin

Physiologie-Clinique, Hôpital Lariboisière,

2, rue A Paré, 75475 Paris CEDEX 10, France

Tel.: ++33/1/49 95 80 88

philippe.bonnin@aphp.fr

ABSTRACT

Purpose To assess the prognostic value of the wall shear stress (WSS) measured in the feeding native arteries upstream from facial superficial arteriovenous malformations (sAVMs). Reliable prognostic criteria are needed to distinguish progres-

sive from stable sAVMs and thus support the indication for an aggressive or a conservative management to avoid severe facial disfigurement.

Materials and Methods We prospectively included 25 patients with untreated facial sAVMs, 15 patients with surgically resected sAVMs and 15 controls. All had undergone Doppler ultrasound examination (DUS) with measurements of inner diameters, blood flow velocities, computation of blood flow and WSS of the feeding arteries. Based on the absence or presence of progression in clinical and imaging examinations 6 months after, we discriminated untreated patients as stable or progressive.

Results WSS in the ipsilateral external carotid artery was higher in progressive compared to stable sAVMs (15.8 ± 3.3 dynes/cm² vs. 9.6 ± 2.0 dynes/cm², mean \pm SD, $p < 0.0001$) with a cut-off of 11.5 dynes/cm² (sensitivity: 92 %, specificity: 92 %, AUC: 0.955, [95%CI: 0.789–0.998], $p = 0.0001$). WSS in the ipsilateral facial artery was also higher in progressive compared to stable sAVMs (50.7 ± 14.5 dynes/cm² vs. 25.2 ± 7.1 dynes/cm², $p < 0.0001$) with a cut-off of 34.0 dynes/cm² (sensitivity: 100 %, specificity: 92 %, AUC: 0.974, [95%CI: 0.819–1.000], $p = 0.0001$). The hemodynamic data of operated patients were not different from those of the control group.

Conclusion WSS measured in the feeding arteries of an sAVM may be a simple reliable criterion to distinguish stable from progressive sAVMs. This value should be considered to guide the therapeutic strategy as well as the long-term follow-up of patients with facial sAVMs.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel Beurteilung des prognostischen Wertes der Wandschubspannung (WSS), gemessen in den zuführenden nativen Arterien stromaufwärts von oberflächlichen arteriovenösen Fehlbildungen des Gesichts (sAVMs). Um progressive von stabilen sAVMs zu unterscheiden sind verlässliche prognostische Kriterien erforderlich, die bei der Indikation für eine aggressive oder konservative Behandlung hilfreich sind, um schwere Gesichtsdeformierungen zu vermeiden.

Material und Methoden Prospektiv wurden 25 Patienten mit unbehandelten sAVMs im Gesicht, 15 Patienten mit chirurgisch-resezierten sAVMs und 15 Kontrollpatienten eingeschlossen. Alle hatten eine Doppler-Ultraschalluntersuchung (DUS) mit Bestimmungen der Innendurchmesser, Blutflussgeschwindigkeiten, Berechnung des Blutflusses und der WSS der zuführenden Arterien. Aufgrund des Fehlens oder Auftretens einer Progression bei den klinischen und bildgebenden Untersuchungen nach 6 Monaten unterschieden wir unbehandelte Patienten als stabil oder progressiv.

Ergebnisse WSS in der ipsilateralen A. carotis externa war bei progressiven sAVMs im Vergleich zu stabilen sAVMs höher ($15,8 \pm 3,3$ dyn/cm² vs. $9,6 \pm 2,0$ dyn/cm², Mittelwert \pm SD, $p < 0,0001$) mit einem Cut-off von $11,5$ dyn/cm² (Sensitivität:

92 %, Spezifität: 92 %, AUC: 0,955, [95 %CI: 0,789 – 0,998], $p = 0,0001$). WSS in der ipsilateralen A. facialis war ebenfalls höher bei den progressiven im Vergleich zu den stabilen sAVMs ($50,7 \pm 14,5$ dyn/cm² vs. $25,2 \pm 7,1$ dyn/cm², $p < 0,0001$) mit einem Cut-off von $34,0$ dyn/cm² (Sensitivität: 100 %, Spezifität: 92 %, AUC: 0,974, [95 %CI: 0,819 – 1,000], $p = 0,0001$). Die hämodynamischen Daten operierter Patienten unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe.

Schlussfolgerung WSS, gemessen in den zuführenden Arterien eines sAVM, kann ein einfache zuverlässiges Kriterium sein, um stabile von progressiven sAVMs zu unterscheiden. Dieser Wert sollte als Richtschnur für die therapeutische Strategie sowie für die langfristige Nachsorge von Patienten mit sAVM im Gesicht angesehen werden.

Introduction

Facial superficial arteriovenous malformations (sAVMs) are rare and may significantly impair the quality of life of the patients because of the aesthetic prejudice. Complete surgical resection or endovascular therapies may be proposed to definitively cure lesions [1, 2]. However, these treatments have significant risks, and the decision for invasive management should be carefully weighed. While stable sAVMs may be managed conservatively with scheduled clinical and radiological follow-ups, a therapeutic window is usually considered for surgical treatment of progressive sAVMs [3, 4]. Thus, the assessment of the aggressiveness of a lesion appears to be crucial in order to determine the most appropriate strategy and to avoid iatrogenic complications. The progression of the disease is usually assessed by composite parameters including modifications on successive clinical examinations, increases in the blood flows in the afferent arteries with consecutive expansion of the nidus on Doppler ultrasound (DUS) traces, magnetic resonance angiography imaging (MRA) and angiograms [5]. Arteriovenous malformations (AVMs) are characterized by neo-formed arteries connected to venous structures through the interposition of a central “nidus” devoid of high resistive arterioles, thus inducing a drop in vascular impedance with high flows and without any vasomotor regulation. Therefore, AVMs significantly and permanently increase the blood flow in the upstream native conduit arteries depending on the degree of expansion of the downstream vascular lesion.

Chronic exposure to permanently elevated blood flow, blood flow velocities (BFVelocities) and wall shear stress (WSS) greater than normal couples hemodynamic events to nitric oxide (NO) production by the endothelial cells of the feeding arteries. The continuous up-regulation of the endothelial NO synthase is responsible for long-term structural arterial vascular remodeling characterized by significant modifications of the cellular (vascular smooth muscle and endothelial cells) and extracellular components of the arterial wall [6, 7]. This results in permanent enlargement of the arterial lumen, as well as medial arterial wall thickening, hypertrophy and fibrosis [8–10]. The final step of vascular remodeling is the normalization of the WSS [11].

Here, we hypothesized that the development of the nidus of a sAVM may expose the feeding native conduit arteries upstream from the nidus to sustained elevated blood flow, BFVelocities and WSS. This phenomenon could consecutively initiate arterial remodeling that may require several months to stabilize [12]. Periods of progression of the nidus may thus induce an imbalance between the arterial inflow and the downstream vascular network in expansion [13]. Conversely, when the sAVM is stable, the achievement of arterial remodeling processes may lead to the normalization of the BFVelocities and WSS even if the blood flow remains elevated.

The objective of this study is to determine whether the WSS measured in the feeding native conduit arteries of a sAVM is an early, reliable, predictive factor of the progression of facial sAVMs.

Patients and Methods

With our institutional review board approval (ID RCB 2015-A01 177–42), we prospectively and consecutively included patients with facial sAVMs admitted to our institution (“centre coordonnateur maladies vasculaires rares”) from January 2017 to September 2017. Written informed consent was obtained from each patient before inclusion in the study.

The inclusion criteria were: 1) patients with untreated facial sAVMs involving the lower part of the face, 2) patients with surgically resected facial sAVMs involving the lower part of the face (inclusion at least 6 months after the surgery). Exclusion criteria were: 1) age < 18 years old, 2) pregnancy, 3) patients with previous endovascular treatment(s) without surgery, 4) patients with postoperative residual sAVMs and/or recurrence of an sAVM after surgical resection. Patients were compared to 15 age- and sex-matched healthy adult controls.

Adjudication of the aggressiveness of the AVMs

All patients had clinical and radiological examination, including MRA imaging and/or conventional arteriography, at inclusion and 6 months after inclusion. Patients were divided into stable and progressive sAVMs by the radiologists at the 6-month follow-up

► Table 1 Patients' baseline characteristics.

		controls (n = 15)	group-1 (operated AVM) (n = 15)	group-2 (stable AVM) (n = 13)	group-3 (progressive AVM) (n = 12)
age (years)	mean (SD) [range]	44 (13) [24 – 62]	42 (15) [18 – 75]	41 (11) [22 – 59]	33 (9) [20 – 50]
gender	male female	6 9	6 9	6 7	5 7
AVM location		–	lip : 12 nose : 3	lip: 10 cheek: 3	Lip: 9 Cheek: 2 Mandible: 1
schobinger stage at the beginning of the study		–	–	stage 1: 0 stage 2: 13 stage 3: 0 stage 4: 0	stage 1: 0 stage 2: 11 stage 3: 0 stage 4: 1
schobinger stage at the end of the study		–	–	stage 1: 0 stage 2: 13 stage 3: 0 stage 4: 0	stage 1: 0 stage 2: 10 stage 3: 1 stage 4: 1
familial history of AVM		–	0	0	0
duration between surgery and Doppler exam (months)	mean (SD) [range]	–	42 (41) [6 – 120]	–	–

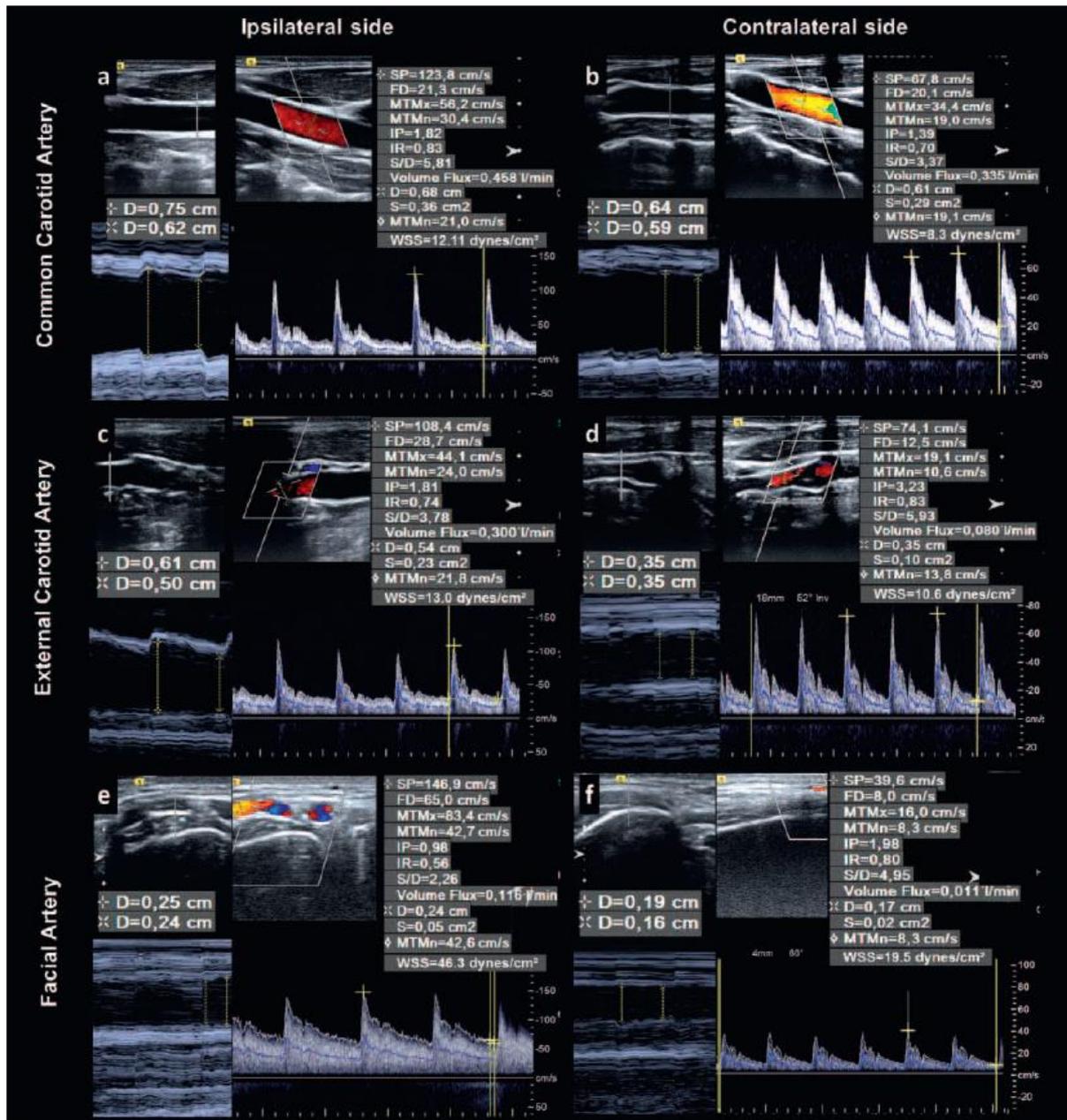
mean (SD)[min-max]. AVM: arteriovenous malformation; –: not concerned.

evaluation according to the absence or presence 1) of clinical modifications such as pain, increase in lesion size, increase in systolic thrill or murmur, and 2) of an expansion of the vascular lesion on imaging examinations and/or progression of the clinical Schobinger classification (stage 1: quiescent stage 2: expansion; stage 3: destruction; stage 4: decompensating). The sonographer was blinded to this stratification. Baseline characteristics are reported in ► Table 1.

Doppler ultrasound exploration

All patients and controls had a Doppler ultrasound examination at inclusion. No one presented any arterial plaque or stenosis, i. e. no one presented an intima-media thickness over 0.8 mm and no one presented individualized hyperechogenic plaque at least on the common carotid arteries (CCA), their bifurcations and the first centimeters of the external (ECA) and internal (ICA) carotid arteries. The clinician and the radiologist were blinded to the inner diameters, BFVelocities measurements as well as blood flow and WSS calculations performed bilaterally in the upstream native conduit arteries. Doppler ultrasound included examinations of the CCA, ICA, ECA and facial (FA) arteries. The inner diameters and BFVelocities were systematically recorded 1) at the mid-height of the neck for the CCAs, 2) before the emergence of the lingual artery for the ECAs, thus before the emergence of the facial artery, 3) after the bulb for ICAs, i. e. when the arterial wall begins to be parallel, and 4) just after the curve of the FA at the inferior border of the mandible.

For all arteries, the inner diameter measurements were performed using M-mode with an echograph ACUSON S2000 (Siemens, Erlangen, Germany) equipped with linear transducers type 9L4 (12 – 7.5) for the cervical arteries and 18L6 HD (18 – 9 MHz) for the facial arteries. Longitudinal cross-sections of the different arteries were successively visualized on the screen 1) with the axis of the artery orthogonal to the M-mode line and zoom for arterial inner diameters measurements, then 2) with angulation of the ultrasound device and use of Doppler beam steer mode in order to decrease the angle between the ultrasound beam and the longitudinal axis of the artery, thus minimizing the angle correction required for the acquisition of the spectral analysis of the Doppler blood flow velocity waveforms (► Fig. 1) [14]. The ultrasound device automatically computed the spatial-averaged-time-averaged mean blood flow velocity (mean-BFVelocity) with the inner diameter for calculation of the blood flow according to the equation (1), where the mean-BFVelocity is in cm/s, and r is the radius of the artery in cm [15]. Velocities and inner diameter measurements were taken in triplicate during quiet respiration and averaged.



► Fig. 1 Doppler ultrasound sample in a patient with progressive sAVM. The inner diameters were measured with M-mode in the common carotid artery (CCA), external carotid artery (ECA) and facial artery (FA) on the ipsilateral side (a, c, e, left) and on the contralateral side (b, d, f, left). Blood flow velocities were recorded in ipsilateral (a, c, e, right) and in the contralateral CCA, ECA and FA (b, d, f, right). The inner diameters, blood flow velocities/volumes and WSS were increased in the three ipsilateral arteries compared to the contralateral side. Moreover, blood flows and WSS's amplitude modifications were higher when closer to the nidus, especially in the ipsilateral FA.

(1) Blood flow = $\pi \cdot r^2 \cdot \text{mean-BFVelocity}$. 60 (mL/min)

The wall shear stress (WSS) was manually calculated from the mean-BFVelocity and inner diameter measurements in triplicate and averaged after data transferred online to a workstation using the formula:

(2) $\text{WSS} = 8 \cdot \mu \cdot \text{mean-BFVelocity} / d$ (dynes/cm²)

where μ is the blood viscosity in poise (P), mean-BFVelocity is the spatial-averaged-time-averaged BFVelocity (cm/s), and d is the diameter (cm). In conduit arteries, blood acts like a Newtonian fluid and a value of 0.035 P for viscosity can be used to calculate the WSS. The normal value for WSS is around 8–10 in large con-

duit arteries and 50 dynes/cm² in the arterioles [16]. Prior to this study, the repeatability of measurements was investigated in 15 different subjects for intra-observer repeatability and in 10 different subjects for inter-observer repeatability. Two series of paired measurements (mBFVelocities and WSS) separated by a 30-minute interval were recorded by experienced practitioners used to examining sAVM patients. The repeatability coefficient (RC) was calculated as defined by the British Standard Institution [17], i.e. according to the formula $RC^2 = \sum Di^2 / N$, where Di is the relative (positive or negative) difference within each pair of measures, and N is the sample. The intra-observer RC values were 0.3, 0.3, 0.5 and 0.6 cm/s for the mBFVelocities in the CCA, ICA, ECA and FA, respectively. The intra-observer RC values for the WSS were 0.2 in the CCA, ICA, ECA and 0.6 dynes/cm² in the FA. The inter-observer RC values were 0.4 to 0.7 cm/s and 0.4 to 0.7 dynes/cm² for the mBFVelocities and the WSS, respectively, in the different studied arteries.

Statistics

Continuous variables (arterial diameters, BFVelocities, blood flows and WSSs) are reported as mean \pm standard-deviation (SD), and range: [min-max]. The Gaussian distribution of the WSS was assessed using the d'Agostini-Pearson test. Categorical data were analyzed using the Chi-squared test or the Fischer's exact test when appropriate. Continuous variables were analyzed with a two-way ANOVA according to the patient groups and normal or pathological side, and with a one-way ANOVA according to the patient groups with post-hoc Student-Newman-Keuls and paired or unpaired Student t-test. In all cases, powers of the statistics tests were verified and considered as significant only when $> 80\%$ (<http://www.anastats.fr>, ANASTATS, Rilly Sur Vienne, France) [18].

A receiver operating characteristics (ROC) curve of Doppler measurements was built and cut-off values were calculated to discriminate between patients with a progressive lesion from those with a stable vascular lesion. The sensitivity, specificity and areas under curves (AUC) with their 95 % confidence intervals (95 %CI) were calculated. The cut-off for WSS values was computed (MedCalc[®] Statistical Software version 18.2.1, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018). Only p-values < 0.005 were considered significant [19].

Results

Clinical data

40 patients (17 males and 23 females) with facial sAVMs with a mean age of 39 ± 13 years were included. 15 patients had a surgically resected sAVM (group-1: Operated sAVM) and 25 had an untreated sAVM. From these last 25 patients, 13 were categorized as stable sAVM (group-2: Stable sAVM) and 12 as progressive sAVM (Group-3: Progressive sAVM) at 6 months after inclusion. 10 progressive AVM patients presented an expansion of their vascular lesion but remained at the same clinical Schobinger staging, and only 2 moved to stage 3 and stage 4. 15 healthy volunteers (males: 6, females: 9) with a mean age of 44 ± 13 years were enrolled to form the control group.

Age and gender were not statistically different between the groups and particularly the WSS was not significantly different between males and females in all groups.

Hemodynamic data

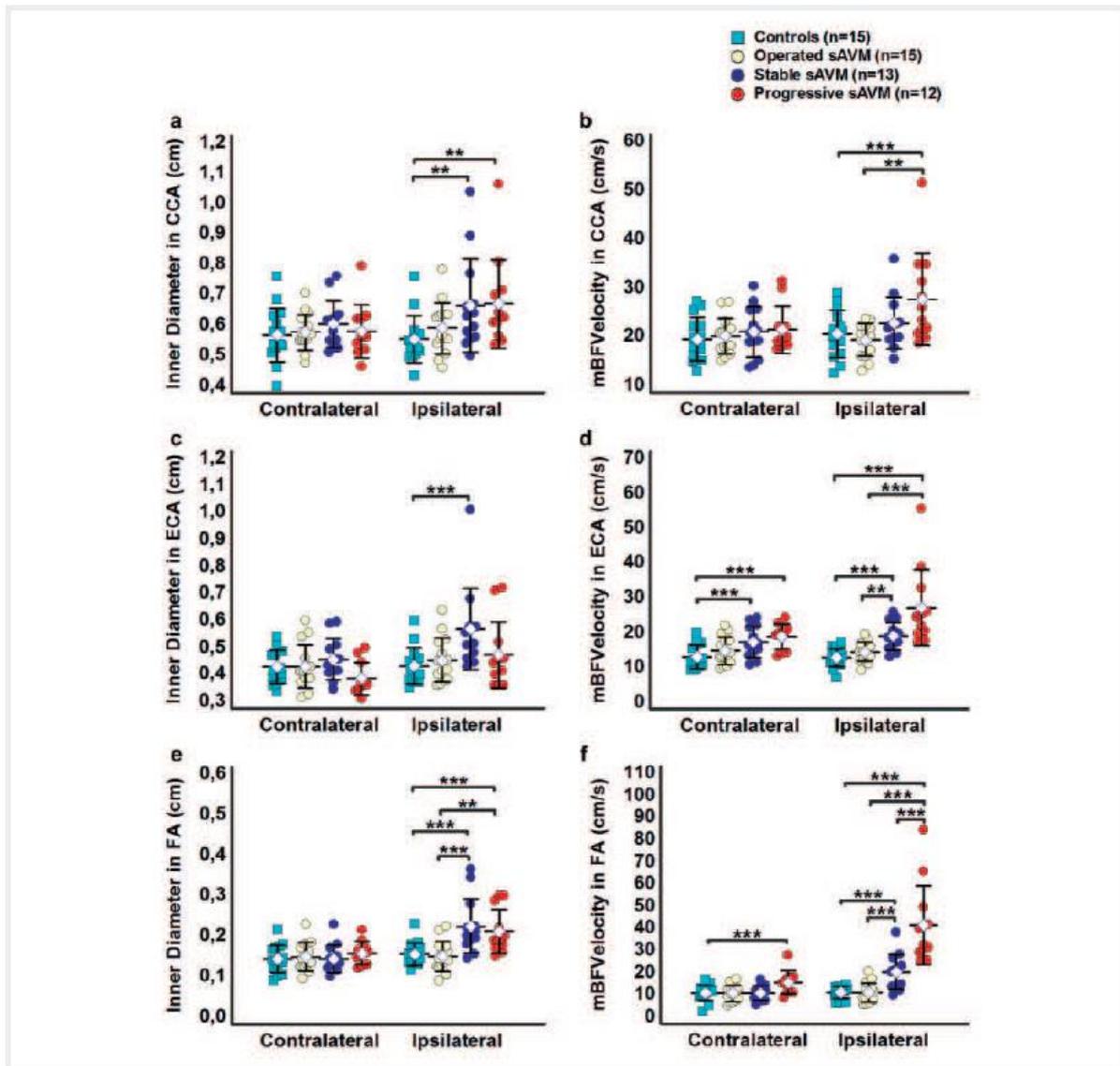
WSSs in the ipsilateral feeding arteries of patients with a stable sAVM were not different from those of the control group. The inner diameters of the ipsilateral CCA, ECA and FA were increased in patients with stable sAVMs when compared to the controls (**► Fig. 2a, c, e**). The mean-BFVelocity measured in the ipsilateral CCA was not significantly different, but it was significantly increased in ECA and FA (**► Fig. 2b, d, f**). Blood flows were then increased in the ipsilateral CCA (531 ± 434 vs. 292 ± 64 mL/min, $p = 0.0042$), ECA (341 ± 296 vs. 120 ± 40 mL/min, $p = 0.0002$), and FA (65 ± 65 vs. 13 ± 6 mL/min, $p < 0.0001$) (**► Fig. 3a,c,e**) but the WSSs were similar compared to the controls in the CCA (9.7 ± 2.1 vs. 10.2 ± 1.8 dynes/cm², $p = 0.8495$), the ECA (9.6 ± 2.0 vs. 8.6 ± 2.2 dynes/cm², $p = 0.2571$) or the FA (25.2 ± 7.1 vs. 22.3 ± 5.3 dynes/cm², $p = 0.1064$) (**► Table 2, ► Fig. 3b, d, f**). The clinical and imaging examinations confirmed the stability of the sAVM at 6.5 ± 2.6 months.

Patients with a progressive sAVM showed highly elevated WSSs when compared to the stable sAVM group. When compared to stable sAVMs, the inner diameters were similar in progressive sAVMs in the ipsilateral CCA, ECA and FA. The mean-BFVelocities were similar in the CCA and in the ECA but increased in the FA (**► Fig. 2b, d, f**). These patients thus had similar blood flows in the three ipsilateral arteries as compared to the stable sAVM patients (**► Fig. 3a, c, e**). In addition, the WSS calculated in the ipsilateral CCA was similar when compared to the stable sAVM group but was higher in the ipsilateral ECA (15.8 ± 3.3 vs. 9.6 ± 2.0 dynes/cm², $p < 0.0001$) and in the ipsilateral FA (50.7 ± 14.5 vs. 25.2 ± 7.1 dynes/cm², $p < 0.0001$) (**► Fig. 1, ► Table 2, ► Fig. 3b, d, f**). Progression of the sAVM was confirmed by the clinical and imaging examinations 7.1 ± 4.8 months after Doppler examination. Otherwise, the contralateral ECA and FA showed similar but lower modifications in patients with progressive sAVM, consecutive to the presence of numerous side-to-side anastomoses (**► Table 3**).

WSS discriminated patients with progressive from stable lesion. WSS aimed to discriminate between stable and progressive patients 1) in the ipsilateral CCA with a sensitivity of 58 % and a specificity of 92 % with a cut-off of 11.2 dynes/cm² (AUC: 0.756, [95 %CI: 0.545 – 0.904], $p = 0.0097$), 2) in the ipsilateral ECA with a sensitivity of 92 % and a specificity of 92 % with a cut-off of 11.5 dynes/cm² (AUC: 0.955, [95 %CI: 0.789 – 0.998], $p = 0.0001$), and 3) in the ipsilateral FA with a sensitivity of 100 % and a specificity of 92 % with a cut-off of 34.0 dynes/cm² (AUC: 0.974, [95 %CI: 0.819 – 1.000], $p = 0.0001$).

Other hemodynamic data

The values of inner diameters, BFVelocities, blood flows, and WSSs in the CCA, ECA and FA were not statistically different in patients with post-surgery sAVMs when compared to the control group (**► Table 2, ► Fig. 2 a – f, ► Fig. 3a – f**). The internal carotid arteries



► Fig. 2 Inner diameters and mean blood flow velocities in the feeding arteries. Inner diameters (a, c, e) and mean blood flow velocities (mBFVels) (b, d, f) in the common carotid (CCA), external carotid (ECA) and facial (FA) arteries. The ipsilateral inner diameters in CCA, ECA and FA were increased in stable sAVMs although the mBFVelocity was normalized. Conversely, mBFVelocity was increased in progressive AVM patients. (Mean±SD, two-way ANOVA with post-hoc unpaired Student t-test, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ between groups).

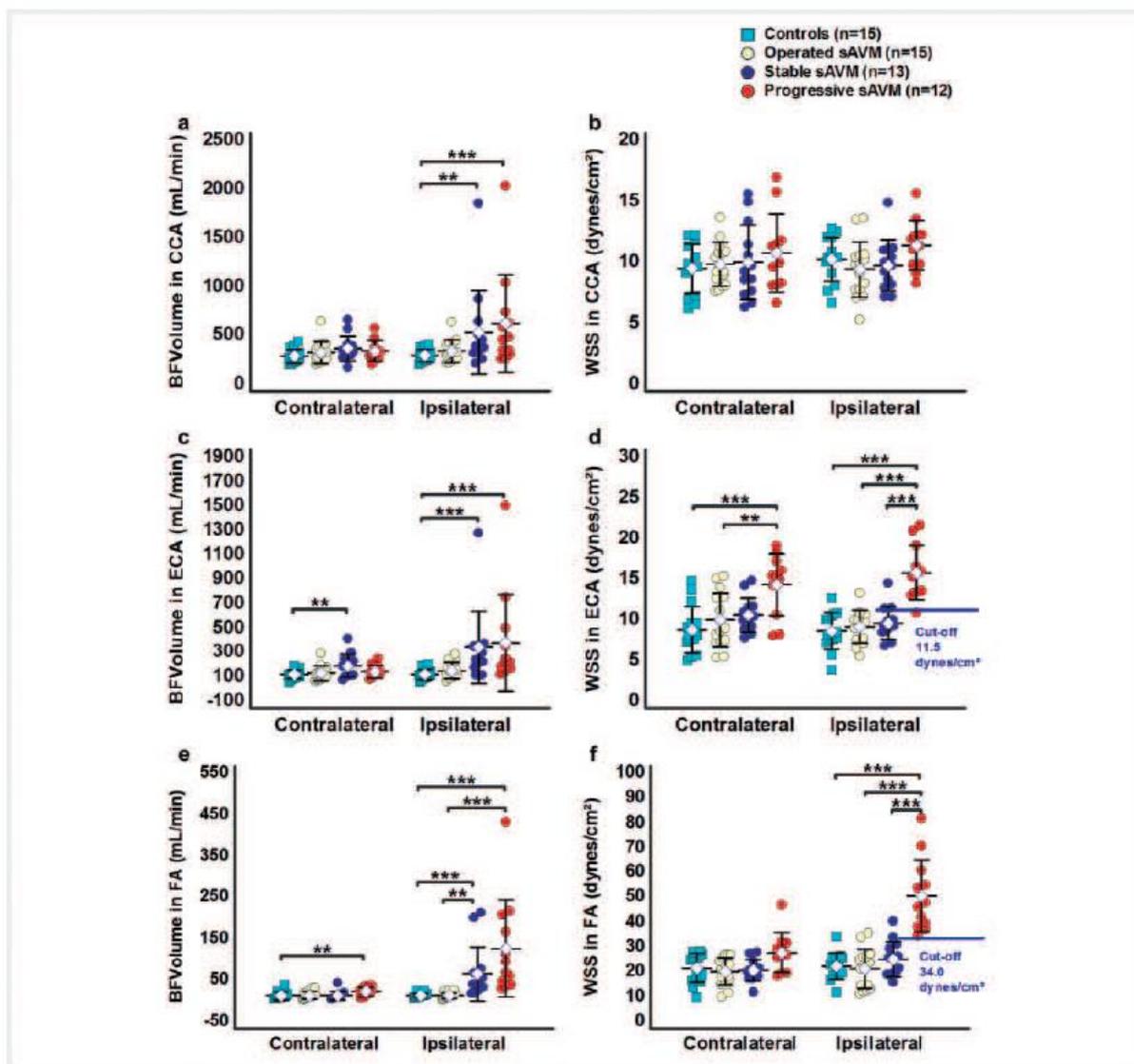
displayed similar Doppler ultrasound findings in each group of patients and were not different from controls (► Table 2, 3).

Discussion

Our study supports the initial hypothesis that the WSS measured in the feeding arteries of a facial sAVM is an early and reliable biomarker of progression. In our patients with a long past evolution leading to inner diameter enlargement of the feeding arteries, we showed that a WSS higher than 11.5 dynes/cm² in the ipsilateral

ECA (diameter ~0.50 cm) was predictive of progression of the disease with a 92% rate of sensitivity and specificity. The threshold value was higher in the smallest feeding arteries proximal to the nidus (34.0 dynes/cm² in the ipsilateral facial artery (diameter ~0.15 cm) with a 100% rate of sensitivity and 92% rate of specificity). Conversely, regardless of the level of blood flow, a lower WSS is predictive of the stability of the sAVM and may reflect the achievement of arterial remodeling.

Finally, patients without residual sAVM 42 months after resection showed similar hemodynamic features compared to controls with normalization of the WSS, suggestive of an achieved regres-



► Fig. 3 Blood flow volumes and wall shear stress in the feeding arteries. Blood flow volumes (BFVols) (a, c, e) and wall shear stress (WSS) (b, d, f) in the common carotid (CCA), external carotid (ECA) and facial (FA) arteries. Ipsilateral blood flows in CCA, ECA and FA were similarly increased in stable and progressive sAVMs. In addition, WSSs were augmented only in progressive but normalized in stable sAVMs with cut-offs at 11.2 in CCA, 11.5 in ECA and 34.0 dynes/cm² in FA. Normalization of the WSS in stable sAVMs was illustrative of achieved arterial remodeling, while its absence in progressive sAVMs was illustrative of the absence of arterial remodeling. (Mean±SD, two-way ANOVA with post-hoc unpaired Student t-test, **p<0.005, ***p<0.001 between groups).

sive remodeling process. In superficial AVMs, the absence of supply of the lesion by the ICAs explains why the hemodynamic values measured in the ICAs were in the normal ranges.

Arterial remodeling requires a regulated process of cellular proliferation, apoptosis, migration, cell organization, and matrix-integrin interactions throughout the layered structure of the vessel. In rabbits, Tronc et al. demonstrated an enlargement of the CCA after its anastomosis with the jugular vein to create an arteriovenous fistula (AVF) [7]. Jo de Mey et al. have developed a comprehensive model in order to investigate small artery response to

hemodynamic changes [20]. Persistent changes in blood flow were induced in juvenile rats by ligating one of the two branches of second-order branches of the superior mesenteric artery. Thus, patent arteries were exposed to high flow, while occluded branches were exposed to minimal flow. This chronic low flow resulted in decreased lumen diameters and hypotrophy of the arterial wall. Conversely, the high flow in the other branches led to increased lumen diameters and arterial wall hypertrophy. The completion of the vascular remodeling processes required 14 to 16 days for both low- and high-flow arteries [21]. Stabilization of the remo-

▶ Table 2 Doppler ultrasound findings on the left side (controls) – affected side (patients)

		diameter (mm)	mean BFVelocity (cm/s)	BFVolume (mL/min)	WSS (dynes/cm ²)
common carotid artery					
ANOVA (p)		0.004	0.001	0.003	0.072
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	5.5 (0.8) [4.4 – 7.6]	20.6 (4.8) [12.6 – 29.1]	292 (64) [201 – 399]	10.2 (1.8) [6.7 – 12.8]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	5.9 (0.8) [4.6 – 7.9]	19.4 (3.3) [13.0 – 23.6]	337 (112) [212 – 638]	9.4 (2.3) [5.3 – 13.6]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	6.6 ¹ (1.5) [5.0 – 10.4]	22.8 (5.3) [15.4 – 36.0]	531 ¹ (434) [215 – 1852]	9.7 (2.1) [7.2 – 14.9]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	6.7 ¹ (1.5) [5.4 – 10.7]	27.7 ^{2,3} (9.4) [18.7 – 51.6]	623 ² (500) [257 – 2032]	11.4 (2.0) [8.3 – 15.6]
internal carotid artery					
ANOVA (p)		0.797	0.667	0.755	0.708
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	4.6 (0.8) [3.6 – 6.4]	18.9 (4.0) [11.2 – 28.6]	185 (43) [107 – 265]	11.9 (4.4) [2.5 – 22.9]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	4.6 (0.7) [3.5 – 6.1]	19.8 (5.1) [13.4 – 33]	197 (59) [112 – 366]	12.6 (5.2) [6.9 – 26.4]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	4.8 (0.6) [4.0 – 5.9]	19.8 (6.0) [11.9 – 33.3]	198 (60) [132 – 325]	11.8 (4.1) [6.8 – 22.7]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	4.5 (0.7) [3.8 – 6.0]	21.0 (5.8) [9.5 – 31.2]	185 (84) [105 – 436]	13.4 (4.7) [4.7 – 21.6]
external carotid artery					
ANOVA (p)		0.001	<0.001	0.001	<0.001
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	4.3 (0.7) [3.5 – 6.0]	12.9 (2.7) [7.1 – 17.2]	120 (40) [53 – 205]	8.6 (2.2) [3.8 – 12.7]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	4.5 (0.8) [3.6 – 6.4]	14.5 (2.7) [9.2 – 19.5]	149 (66) [60 – 283]	9.6 (2.2) [5.5 – 14.7]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	5.7 ^{2,7} (1.5) [4.3 – 10.1]	19.1 ^{2,3} (3.9) [13.1 – 25.9]	341 ² (296) [114 – 1278]	9.6 (2.0) [6.8 – 14.5]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	4.7 (1.2) [3.6 – 7.2]	27.2 ^{2,4,5} (10.9) [17.3 – 55.7]	378 ² (398) [118 – 1502]	15.8 ^{2,4,6} (3.3) [10.9 – 21.7]
facial artery					
ANOVA (p)		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	1.6 (0.3) [1.2 – 2.3]	10.9 (2.8) [5.9 – 14.4]	13 (7) [6 – 25]	22.3 (5.3) [11.5 – 34.4]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	1.5 (0.4) [0.9 – 2.3]	11.0 (4.2) [5.5 – 20.4]	13 (7) [3 – 27]	21.2 (7.9) [11.1 – 35.7]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	2.2 ^{2,4,7} (0.7) [1.5 – 3.7]	20.3 ^{2,7} (7.8) [9.9 – 38.3]	65 ^{2,3} (65) [18 – 213]	25.2 (7.1) [15.9 – 40.5]

► Table 2 (Continuation)

		diameter (mm)	mean BFVelocity (cm/s)	BFVolume (mL/min)	WSS (dynes/cm ²)
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	2.1 ^{2,3} (0.5) [1.5–3.0]	41.3 ^{2,4,6,8} (17.7) [25.3–84.3]	126 ^{2,4} (117) [30–433]	50.7 ^{2,4,6,8} (14.5) [34.7–81.8]

mean (SD) [min-max]; AVM: arteriovenous malformation; BFVelocity: blood flow velocity; BFVolume: blood flow volume; WSS: wall shear stress. One-way ANOVA was performed on each artery according to the patient groups with post-hoc Student-Newman-Keuls and unpaired Student t-test.

¹ p < 0.005, AVM groups vs. controls

² p < 0.001, AVM groups vs. controls

³ p < 0.005, stable or progressive vs. operated AVM

⁴ p < 0.001, stable or progressive vs. operated AVM

⁵ p < 0.005, progressive vs. stable AVM

⁶ p < 0.001, progressive vs. stable AVM

⁷ p < 0.005, pathological side vs. normal side in AVM patients groups and the left side to the right side in controls

⁸ p < 0.001, pathological side vs. normal side in AVM patients groups and the left side to the right side in controls

► Table 3 Doppler ultrasound findings on the right side (controls) – unaffected side (patients)

		diameter (mm)	mean BFVelocity (cm/s)	BFVolume (mL/min)	WSS (dynes/cm ²)
common carotid artery					
ANOVA (p)		0.407	0.772	0.105	0.053
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	5.7 (0.9) [4.0–7.6]	19.4 (4.5) [12.9–27.2]	286 (68) [199–430]	9.5 (2.0) [6.2–12.2]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	5.8 (0.6) [4.8–7.1]	20.1 (3.7) [15.1–27.1]	323 (112) [198–645]	9.8 (1.8) [7.7–13.7]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	6.0 (0.8) [5.1–7.6]	21.0 (5.2) [13.8–30.4]	364 (127) [173–660]	10.0 (3.0) [6.3–15.6]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	5.8 (0.9) [4.7–8.0]	21.5 (4.8) [17.5–31.5]	340 (102) [198–572]	10.7 (3.2) [6.7–16.9]
internal carotid artery					
ANOVA (p)		0.182	0.314	0.404	0.566
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	4.5 (0.5) [3.8–5.4]	18.7 (5.2) [10.0–30.6]	177 (45) [109–270]	11.4 (4.3) [4.7–21.7]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	4.6 (+0.9) [3.3–6.1]	19.6 (6.5) [10.6–34.5]	192 (84) [114–456]	12.6 (6.3) [3.0–26.8]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	4.9 (0.6) [3.8–6.2]	20.1 (6.5) [11.0–35.4]	218 (67) [133–353]	11.7 (5.0) [4.2–21.5]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	4.3 (0.7) [3.7–5.7]	21.7 (4.1) [13.6–29.1]	187 (61) [130–325]	13.9 (3.1) [6.7–17.2]
external carotid artery					
ANOVA (p)		0.097	<0.001	0.007	<0.001

► Table 3 (Continuation)

		diameter (mm)	mean BFVelocity (cm/s)	BFVolume (mL/min)	WSS (dynes/cm ²)
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	4.3 (0.6) [3.4–5.4]	13.3 (3.8) [9.2–22.2]	116 (34) [52–179]	8.8 (2.9) [5.0–14.7]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	4.3 (0.8) [3.2–6.0]	14.9 (3.9) [9.7–22.1]	122 (61) [63–292]	10.0 (3.3) [5.3–15.3]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	4.6 (0.8) [3.5–6.0]	17.4 ¹ (4.5) [11.0–24.4]	188 (95) [70–414]	10.6 (2.1) [7.7–14.8]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	3.8 (0.6) [3.1–5.0]	18.9 ¹ (3.6) [13.2–24.4]	141 (51) [77–250]	14.3 ^{1,2} (3.8) [8.0–19.1]
facial artery					
ANOVA (p)		0.763	0.002	0.020	0.008
controls (n = 15)	mean (SD) [range]	1.4 (0.3) [0.9–2.2]	10.6 (3.5) [2.6–16.9]	12 (9) [4–38]	21.6 (5.8) [9.7–28.2]
operated AVM (n = 15)	mean (SD) [range]	1.5 (0.4) [1.0–2.3]	10.6 (3.5) [5.2–17.1]	13 (9.0) [3–31]	20.2 (5.6) [9.9–27.0]
stable AVM (n = 13)	mean (SD) [range]	1.4 (0.3) [1.0–2.3]	10.7 (3.1) [5.5–16.6]	13 (10) [4–44]	20.8 (4.3) [11.8–28.1]
progressive AVM (n = 12)	mean (SD) [range]	1.6 (0.3) [1.2–2.2]	15.6 ¹ (5.2) [8.6–27.8]	22 (11) [7–36]	27.9 (8.0) [18.5–47.1]

mean (SD) [min-max]; AVM: arteriovenous malformation; BFVelocity: blood flow velocity; BFVolume: blood flow volume. One-way ANOVA was performed on each artery according to the patient groups with post-hoc Student-Newman-Keuls and unpaired Student t-test. WSS: wall shear stress.

¹ $p < 0.001$, AVM groups vs. controls

² $p < 0.005$: stable or progressive vs. operated AVM

deling process has been previously assessed with normalization of the WSS in the contralateral ICA to complete occlusion of ipsilateral ICA [12]. In intracranial AVMs, Alaraj et al. have previously measured a high WSS in the feeding arteries before treatment. The WSS and blood flows were decreased after treatment [22]. On the other hand, Rossiti et al. have shown normal WSS values in the feeding arteries of brain AVMs when compared to the contralateral side, while inner diameters and blood flows were increased [23]. They concluded that the arterial remodeling, through the increase of the inner diameter of the artery, was responsible for the normalization of the WSS in non-evolutionary AVMs. Our study supports this last theory since the WSS measured in the feeding arteries was in the normal ranges in stable sAVMs, while it was significantly increased in the progressive ones. Nevertheless, these two authors did not use the modifications of the WSS as a biomarker of AVM progression.

Limitations and strength of the present study

The relatively small number of patients may be considered as a limitation of this study. However, sAVMs represent a rare topic in

vascular diseases, and significant hemodynamic results were demonstrated despite this. We found a mean WSS of 10.2 ± 1.8 dynes/cm² in the CCA of control patients. In a previous study using Doppler ultrasound measurements, Samijo et al. reported values of 13 ± 3 in healthy men and 12 ± 2 dynes/cm² in healthy women. Oshinski et al. reported a spatial-average-time-average WSS of 8.0 ± 4.1 dynes/cm² in the CCA of healthy volunteers measured using MRA imaging [24]. Here, we decided to compute the WSS from Doppler ultrasound data and not from MRA data [25–28]. Our purpose was to establish a reliable method of WSS calculation based on a noninvasive, low-cost, easily accessible examination with little or no post-processing tasks. Only one Doppler ultrasound examination was needed. Measurement of the WSS by conventional Doppler ultrasound is said to be difficult due to the assumptions made to calculate the WSS. The dependence of blood viscosity on hematocrit is more pronounced in the microcirculation (lumen diameter $< 100 \mu\text{m}$) than in larger vessels. In most cases in which the measurement of blood viscosity is not feasible, the value 3.5 cP can be used instead because blood acts like a Newtonian fluid in large vessels like those ex-

plored in this study [16]. Moreover, the use of a strict protocol of measurement of inner diameter by M-mode and BFlow velocities using the steer mode in order to decrease the angle correction strongly helps to increase the accuracy of measurement and calculation of the different studied parameters.

In conclusion, Doppler ultrasound-derived wall shear stress calculated in feeding native conduit arteries far upstream from a superficial arteriovenous malformation seems to be a simple, accessible and reliable marker of disease progression. Increasing the number of patients and implementing these data with clinical and morphology examinations could help to build a more powerful predictive algorithm and significantly improve the management of patients with sAVMs. Further studies are needed to confirm these preliminary findings.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We gratefully thank the "Société Française de Radiologie" for grant support to Imane El sanharawi.

References

- [1] Mulligan PR, Prajapati HJ, Martin LG et al. Vascular anomalies: classification, imaging characteristics and implications for interventional radiology treatment approaches. *Br J Radiol* 2014; 87: 20130392
- [2] Dubois J, Alison M. Vascular anomalies: what a radiologist needs to know. *Pediatr Radiol* 2010; 40: 895–905
- [3] Morgan P, Keller R, Patel K. Evidence-based management of vascular malformations. *Facial Plast Surg* 2016; 32: 162–176
- [4] Lee BB, Baumgartner I, Berlien HP et al. International union of angiology. Consensus document of the international union of angiology (IUA)-2013. Current concept on the management of arterio-venous management. *Int Angiol* 2013; 32: 9–36
- [5] Uller W, Alomari AI, Richter GT. Arteriovenous malformations. *Semin Pediatr Surg* 2014; 23: 203–207
- [6] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998; 10: 731–736
- [7] Tronc F, Mallat Z, Lehoux S et al. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: E120–E126
- [8] Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P et al. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 1997; 272: H851–H858
- [9] Tronc F, Wassef M, Esposito B et al. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1256–1262
- [10] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75: 519–560
- [11] Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986; 231: 405–407
- [12] Kubis N, Checoury A, Tedgui A et al. Adaptive common carotid arteries remodeling after unilateral internal carotid artery occlusion in adult patients. *Cardiovasc Res* 2001; 50: 597–602
- [13] Lehoux S, Lévy BI. Collateral artery growth: making the most of what you have. *Circ Res* 2006; 99: 567–569
- [14] Bonnin P, Coelho J, Pocard M et al. Anti-TNF α therapy early improves hemodynamics in local intestinal and extraintestinal circulations in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 451–459
- [15] Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics* 2003; 13: 227–239
- [16] Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hell J Cardiol* 2005; 46: 9–15
- [17] British Standards Institution. Precision of Test Method (BS5497, part 1). London: BSI. 1979
- [18] Moyé L. Statistical methods for cardiovascular researchers. *Circ Res* 2016; 118: 439–453
- [19] Johnson VE. Revised standards for statistical evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 19313–19317
- [20] Pourageaud F, De Mey JG. Vasomotor responses in chronically hyperperfused and hypoperfused rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1998; 274: H1301–H1307
- [21] Buus CL, Pourageaud F, Fazzi GE et al. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ Res* 2001; 89: 180–186
- [22] Alaraj A, Amin-Hanjani S, Shakur SF et al. Quantitative assessment of changes in cerebral arteriovenous malformation hemodynamics after embolization. *Stroke* 2015; 46: 942–947
- [23] Rossitti S, Svendsen P. Shear stress in cerebral arteries supplying arteriovenous malformations. *Acta Neurochir (Wien)* 1995; 137: 138–145
- [24] Oshinski JN, Curtin JL, Loth F. Mean-average wall shear stress measurements in the common carotid artery. *J Cardiovasc Magn Reson* 2006; 8: 717–722
- [25] Efstathopoulos EP, Patatoukas G, Pantos I et al. Measurement of systolic and diastolic arterial wall shear stress in the ascending aorta. *Phys Med* 2008; 24: 196–203
- [26] Peng SL, Shih CT, Huang CW et al. Optimized analysis of blood flow and wall shear stress in the common carotid artery of rat model by phase-contrast MRI. *Sci Rep* 2017; 7: 5253
- [27] Piatti F, Sturla F, Bissell MM et al. 4D Flow Analysis of BAV-Related Fluid-Dynamic Alterations: Evidences of Wall Shear Stress Alterations in Absence of Clinically-Relevant Aortic Anatomical Remodeling. *Front Physiol* 2017; 26: 441
- [28] Wu SP, Ringgaard S, Oyre S et al. Wall shear rates differ between the normal carotid, femoral, and brachial arteries: an in vivo MRI study. *J Magn Reson Imaging* 2004; 19: 188–193

3.4 Carcinose péritonéale d'origine ovarienne chez la souris et chez la femme

Barral Matthias, Pimpie Cynthia, F. Roby Katherine, Kaci Rachid, Pocard Marc, Bonnin Philippe. Assessment of tumoral response in mice with Ovarian Peritoneal Carcinomatosis using Doppler Ultrasound of the Superior Mesenteric Artery and Celiac Trunk.

3.4.1 Introduction

L'évaluation en imagerie par TDM ou IRM des patientes atteintes de carcinose péritonéale d'origine ovarienne est difficile car il n'existe pas de critères standardisés, ni bien établis (35). L'AMS et le tronc cœliaque vascularisent une grande partie de la cavité abdominale sur laquelle se greffe la plupart des implants de carcinose (127). Il a été démontré que les vitesses et le débit sanguin mesuré par échographie Doppler de l'AMS étaient augmentés chez les souris et patients atteints de PMP (128–130). De plus, chez les souris *Nude* présentant une greffe orthotopique de PMP traitée par bevacizumab, une diminution des vitesses sanguines de l'AMS était corrélée à la diminution du lit vasculaire (128). En outre, l'augmentation postopératoire des vitesses sanguines permet de distinguer les patients atteints d'une maladie évolutive lente de ceux présentant une maladie rapidement progressive (129). L'échographie Doppler de l'AMS apparaît donc comme une technique d'imagerie fonctionnelle robuste informative reflétant les modifications du réseau vasculaire intestinal.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel de l'échographie Doppler de l'AMS et du tronc cœliaque pour évaluer la réponse tumorale chez des souris C57BL6 atteintes de carcinose péritonéale d'origine ovarienne murine traitées par bevacizumab ou carboplatine.

En parallèle nous avons mesuré les vitesses et débits circulatoires dans l'AMS de 23 patientes atteintes de masse ovarienne suspecte de carcinose péritonéale sur une imagerie en coupe préopératoire. Les résultats ont été corrélés à l'ICP per-opératoire.

3.4.2 Résultats et conclusions

Cette étude a permis de mettre au point un protocole de carcinose péritonéale fiable avec 100% de souris atteinte et une ascite hémorragique de grande abondance, reflet de la clinique. De plus, il s'agit d'un modèle de souris immunocompétente dont le suivi est possible par bioluminescence et échographie Doppler de l'AMS et du tronc cœliaque. Dans ce modèle, le carboplatine était efficace au contraire du bevacizumab. En effet, les souris traitées par carboplatine avaient un poids, un ICP et des vitesses circulatoires moyennes dans l'AMS et dans le tronc cœliaque inférieurs aux souris non traitées, et aucune ascite. Les souris traitées par bevacizumab ne présentaient aucune différence avec les souris non traitées. Les vitesses dans l'AMS et le tronc cœliaque étaient corrélées à l'ICP avec $r = 0,70$ ($p < 0,0001$) et $r = 0,58$ ($p = 0,0003$) respectivement. De plus, les résultats en immunohistochimie montrent qu'il existe une diminution de la prolifération cellulaire (Ki 67) et de la densité vasculaire (CD 31) induite par le traitement par carboplatine. Ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle l'expansion du lit vasculaire tumoral couplée à la prolifération cellulaire est responsable d'une augmentation des vitesses circulatoires dans les artères nourricières en amont de l'organe où s'est développée la tumeur.

Notre protocole a permis de mettre en évidence la supériorité d'un traitement sur un autre chez des souris immunocompétentes avec carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Ce protocole pourrait servir de banc d'essai pour tester en préclinique des nouvelles cibles

thérapeutiques en diminuant le nombre d'animaux nécessaire grâce au suivi non invasif par échographie Doppler.

Par ailleurs, une étude préliminaire chez des patientes avec suspicion de carcinose péritonéale d'origine ovarienne à l'imagerie a mis en évidence des vitesses et un débit élevés dans l'AMS élevés, corrélé à l'ICP, $r = 0,81$ ($p < 0,01$). La mesure des vitesses et des débits dans l'AMS par échographie Doppler des patientes avec carcinose péritonéale d'origine ovarienne semble intéressante pour le diagnostic et le suivi de la maladie. Une étude complémentaire sur le suivi sous traitement et diagnostic de la récurrence est en cours.

Manuscrit en cours de préparation, les analyses anatomo-pathologiques sont en cours de finalisation.

Assessment of tumor response in mice with Ovarian Peritoneal Carcinomatosis using Doppler Ultrasound of the Superior Mesenteric Artery and Celiac Trunk.

Abstract

Background

Tumor response of pseudomyxoma peritonei can be assessed by Doppler ultrasound (US) of the superior mesenteric artery (SMA).

Objective

To assess the performance of Doppler US of the SMA and coeliac trunk (CT) in the evaluation of tumoral response in mice with ovarian peritoneal carcinomatosis (PC) treated either with bevacizumab or carboplatin.

Methods

Twenty C57Bl06 mice were intraperitoneally grafted with ID8-Luc ovarian cancer cells. Eight weeks after, they were treated during 4 weeks either with bevacizumab (n=10) or carboplatin (n=10) and compared to 20 untreated ID8-Luc mice and 10 healthy mice. Animals were weighted twice weekly and had measurement of the mean blood flow velocity (mBFVel) in the SMA and CT using Doppler US at 0, 2 and 4 weeks. Peritoneal carcinomatosis index (PCI), Ki67 and CD31 immunofluorescence staining on tumor nodules were finally performed.

Results

Mice treated with carboplatin compared to untreated mice had a lower weight (23.33 ± 2.0 vs 27.9 ± 2.9 g, $p < 0.001$), PCI (11 ± 3 vs 28 ± 6 , $p < 0.001$), and mean BFVel in the SMA (6.9 ± 1.4 vs

11.0±1.8 cm/s, p=) and in the CT (8.0±1.8 vs 14.3±4.6 cm/s, p<0.001) and no ascites compared to the others groups. Carboplatin decreased Ki67 positive staining (p<0.001) and vascular density (p<0.001). Mice treated with bevacizumab did not present any difference with untreated ones. The mBFVels in the SMA and in the CT were correlated to the PCI with r=0.70 (p<0.0001) and r=0.58 (p=0.0003) respectively.

Conclusion

ID8-Luc/C57B6 mice treated with carboplatin have a lower PCI. The mBFVels in the SMA and CT is lower in carboplatin-treated mice.

Key-words: Peritoneal carcinomatosis – ovarian peritoneal carcinomatosis – Doppler ultrasound – tumoral response – Superior mesenteric artery – celiac trunk

INTRODUCTION

Imaging evaluation of patients with peritoneal carcinomatosis (PC) is based on morphological examination such as computed tomography or magnetic resonance imaging, but assessment of progression or stability of the disease is difficult as there are no standardized and not well-established criteria as those used for solid tumors [35]. The implants of peritoneal carcinomatosis (PC) are distributed according to the direction of circulation of the peritoneal fluid and breathing: within the mesentery, epiploon, paracolic gutters, subdiaphragmatic space, on the surface of the liver, spleen and stomach [128]. The superior mesenteric artery (SMA) supplies the mesentery and the visceral peritoneum and also the intestine from the lower part of the duodenum through two-thirds of the transverse colon, as well as the pancreas. On the other hand, the celiac trunk (CT) supplies the stomach, the liver, the spleen, the diaphragmatic cupolas, the upper duodenum and the pancreas. Doppler ultrasound (US) is

a non-invasive imaging that allows identification of vascular structures of interest and the measurement of mean blood flow velocities (mBFVel). It has been demonstrated that the mBFVel and mean Blood Flow volume (mBFVol) are increased in the SMA of mice as well as patients with peritoneal pseudomyxoma [127, 129, 130]. In addition, Nude mice with orthotopic graft of pseudomyxoma peritonei (PMP) treated with bevacizumab had a decrease in mBFVels in the SMA correlated with the decrease of the vascular bed (imaging by immune staining techniques with CD31, vascular endothelial cadherin, and desmin) [127]. Moreover, post-operative increase of the mBFVels allows distinguishing between patients with slowly progressive and active progressive disease [129].

The Doppler US of the SMA appears therefore as a hardy informative functional imaging technique that reflects changes in the intestine vascular network. Regarding secondary tumors, only one study has reported an increase in the mBFVels of the SMA and CT of Balb/c mice with intraperitoneal injection of CT-26 colorectal cancer cells [131]. Others studies have reported the usefulness of the mBFVels monitoring in the CT to follow the development of liver metastasis after intrasplenic injection of CT-26 colorectal cancer cells [121] and of a spontaneous hepatocarcinoma in SV40-T transgenic mice [122]. In addition, Doppler US allows the monitoring of anticancer treatment already used in human pathologies or new treatments [124, 127, 129, 132]. To our knowledge, if only one study demonstrated the possibility to follow ovarian PCs in rat and the effects of PIPAC using bioluminescence, no study has investigated the potential of Doppler US in the SMA to assess tumor response in ovarian PC and especially using an orthotopic murine-derived ovarian cell line [133].

The objective of this study was to assess the potential of Doppler US of the SMA and CT to assess tumor response in mice with ovarian peritoneal carcinomatosis (PC) treated either with bevacizumab or carboplatin.

METHODS

Cell culture

The ID-8 cells were provided by Katherine F. Roby, PhD (Research Associate Professor, The university of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Blvd., 1018, Kansas City, KS 66160. USA). The ID8 cells were grown as monolayers in DMEM (D6428, Sigma) culture medium supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), and 1% ITS (Insulin 5 μ g/ml, Transferrin 5 μ g/ml, Sodium Selenite 5ng/ml, ref I1884, Sigma) buffer solution in a humidified incubator at 37°C (5% CO₂ and 95% air). Firefly luciferase was transduced to ID8 cells using a lentiviral system (Gen target Inc, Sandiago, California). Then ID8-Luc cells were grown similarly.

Animals

The protocol used was approved by Local Ethic Committee (Protocol apafis N3944). Thirteen-week-old multi parturient female, hepatitis virus-free, and immunocompetent C57BL06 females weighing 20 \pm 0.5 g (Charles River, Arbresle, France) were housed in our specific pathogen-free compliant animal facility. Animals were acclimated for one week before experimentation. Bioluminescence optical imaging was performed 4 and 6 weeks after ID8-Luc cells injection to assess PC extension (Figure 1). Then, 8 weeks after ID8-Luc cells injection, mice were divided and randomly assign to 3 groups according to the intensity of bioluminescence: animals that only received ID8-Luc cells (Group 1, n=10), intraperitoneal injection of bevacizumab 5mg/kg twice a week) (Group 2, n=10), and intraperitoneal injection of carboplatin (16mg/kg every 4days) (Group 3, n=10). In addition, an untreated group of 20 age-matched healthy C57BL06 mice (Group 4, n=20) was considered as a control group. The flow charts are shown in Figure 2. Animals were weighted twice a week during the

experiments. Animals were euthanized 4 weeks after randomization by cervical dislocation and exsanguination under general anesthesia. The extension of PC was quantified, post-mortem, using the Peritoneal Cancer Index (PCI) score [50] adapted to tumor sizes in mice [134, 135]. Heparinized blood was obtained by cardiac puncture, ascites, liver, peritoneum and the larger nodules were collected for analysis.

Pathology & Immunofluorescence staining

After sacrifice of animals at week 4 after treatment, peritoneal carcinomatosis nodules from the untreated, bevacizumab-treated and carboplatin-treated groups were obtained for macroscopy and immunofluorescence staining.

For macroscopy, nodules were kept into formaldehyde 4% and a tumor regression grade (TRG) was performed.

For immunofluorescence staining, nodules were flash frozen in liquid nitrogen at 20 wk. Livers were then sliced using a cryostat at -14°C. Nodules sections were fixed for 10 min in ice-cold 90% acetone and maintained at -80°C until staining. Nodules sections were incubated 1 h at room temperature with 5% bovine serum albumin–phosphate-buffered saline–Tween 0.1% solution for blocking. Then, incubation of three sections per Nodules with primary antibody against either CD31 (1/50) or Ki67 (1/50) was performed overnight at 4°C. After being washed, nodules sections were incubated with the appropriate secondary antibody (1/200). Images were captured and analyzed with a Zeiss Observer Z1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Ki67 surface staining was assessed using x40 images. Each image was evaluated and visually classified in quartile as follows: 0-25%, 25-50%, 50-75%, and 75-100% of positive

surface. Tumor angiogenesis was assessed by staining for CD31, a surface marker of endothelial cells, and subsequent evaluation of vessel numbers and vascular lumen area per field. For CD31 staining, number of vessels per field (at least five fields/slide) was assessed using Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), that permitted to evaluate the vascular density and the vascular length density measurement in percentage of area.

Imaging protocol

Forty C57BL06/ID8-Luc mice had Doppler US of the SMA and CT the day of randomization using our imaging protocol as previously published every 2 weeks during 4 weeks after [136]. Briefly, animals had measurement of mBFVel in the CT and SMA using Doppler US under volatile anesthesia (isoflurane 0.5% under ambient air. An ACUSON S3000 (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) equipped with a 14-MHz probe was used. Color Doppler mode (7.5 MHz) was activated on an anterior longitudinal view of the abdomen crossing the longitudinal axis of the aorta. The CT and SMA were then drawn and localized on the screen by their color-coded blood flow. Spectral analyses of the Doppler signal recorded in the CT and SMA were successively acquired using a 7.5-MHz pulsed Doppler ultrasound frequency. The sample volume was set at 1 mm³, and the low-velocity rejection rate at 0.6 cm/s. The minimum detectable velocity was about 1 cm/s, and the maximum was 150 cm/s.

Statistics

Weights, mBFVel in the CT and SMA were compared between groups using a two-way ANOVA test (depending on treatments and the time of examination). The PCI calculated at the end of the experiment were compared between groups using a one-way ANOVA test (depending on treatments). The mBFVel measured in the CT and SMA were correlated to the

PCI and weight, using a Pearson test (MedCalc® Statistical Software version 18.2.1, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). The degree of significance of the selected tests was $p < 0.005$ (Johnson Proc Natl Acad Sci USA 2013).

RESULTS

Peritoneal graft of ID8-Luc cells induced an hemorrhagic PC in 8 weeks with presence of micro and macro tumor nodes disseminated in the peritoneal cavity (Figure 3).

ID-8 cells

Carboplatin, but not bevacizumab, inhibits progression of PC in ID8-Luc/C57B6 mice (Table 1)

Eight weeks after ID8-Luc cells injection the weight (23.3 ± 0.6 g), PCI (11 ± 3), and mean BFVel in the SMA (7 ± 0.8 cm/s) and the CT (7.9 ± 1.1 cm/s) were lower in the carboplatin-treated than in untreated mice (27.7 ± 0.5 g ($p < 0.001$); 28 ± 6 ($p < 0.001$) and 10.7 ± 0.6 cm/s ($p < 0.001$); 15.1 ± 0.9 cm/s ($p < 0.001$) and bevacizumab-treated mice (27.6 ± 0.6 ($p < 0.001$); 26.1 ± 3.6 ($p < 0.001$) and 10 ± 0.8 cm/s ($p < 0.001$); 14.44 ± 1.09 cm/s ($p < 0.001$) (Figure 4). Those results were similar between the bevacizumab-treated and the untreated C57BL06/ID8-Luc (21.8 ± 0.6 g; 7.2 ± 0.8 cm/s; 10.5 ± 1.1 cm/s). In addition, untreated C57BL06/ID8-Luc and bevacizumab-treated group demonstrated an abundant ascites whereas there were no ascites in the carboplatine-treated group. The mBFVel in the SMA and CT were correlated with the PCI $r=0.70$ and $r=0.56$ respectively. Moreover, the mBFVel in the SMA was highly correlated with the PCI within the mesentery $r=0.9$. (Figure 5)

In accordance with the evolution of PCI, carboplatin significantly inhibited tumor proliferation as assessed by quantification of the percentage of Ki67- positive mitotic nuclei in

histologic sections of peritoneal nodules from treated animals compared with untreated mice. (**Figure 7**). In carboplatin treated mice, 61% of specimen analyzed had <25% area of Ki 67 positive staining and 25% in untreated mice. Conversely, 92% of specimen in untreated mice had >75% Ki 67 positive staining and none in carboplatin treated mice.

Similarly, carboplatin decreased the density of vessels (**Figure 8**). The mean vascular density was 34% in untreated mice and 21% in carboplatin treated mice ($p<0.001$); the mean vascular length density was 3.2% in untreated mice and 2.1% in carboplatin treated mice ($p<0.001$).

DISCUSSION

The decreased of the mean Blood Flow Velocity measured in the SMA and CT using Doppler US is associated to tumor response to carboplatin in ID8-Luc/C57BL06 mice with peritoneal carcinomatosis of ovarian origin. The intraperitoneal injection of 10 million of ID8 cells resulted in a PC with hemorrhagic ascites in 100% of mice. Thus, this protocol was robust to create a PC in immunocompetent C57B6 mice.

Tumor growth is strongly driven by an angiogenic switch that enhances the metastatic and invasive potential [137]. Angiogenesis is responsible for an expansion of the tumor microvascular bed. This neo-formed vascular network decreases the hemodynamic resistance downstream from the native afferent artery supplying the organ where the tumor grows. Doppler US can be performed in this afferent artery to detect hemodynamic changes reflecting the modifications of the tumor vascular network [127, 130, 131, 136]. More precisely, according to Poiseuille's law, local BFVol is adjusted according to the changes of local hemodynamic resistance. When tumor tissues develop within an organ, metabolic demands increase, inducing sprouting angiogenesis originating from the vascular network of the native organ. This results in an increase of the micro-vascular bed of the organ where

tumor tissue develops. Local hemodynamic resistance thus falls and the BFVolume in the feeding artery increases.

Our study demonstrates that carboplatin is more efficient than bevacizumab in ID8-Luc/C57BL06 mice with ovarian PC and that its effect is obtained after 4 weeks of treatment. More precisely, there was no difference between groups in BFVel in CT and SMA after 2 weeks of treatment. However after 4 weeks, BFVel of the SMA and CT in Carboplatin-treated mice were similar to untreated and non-injected mice, despite a PCI of 10. However, the thorough analysis of the repartition of the location of PC implants reveals that animals treated with carboplatin had far lesser implants in the mesentery than their counterparts. This suggests that Doppler US is not enough sensitive to depict early hemodynamic changes in the upstream native artery and that there is a minimum PC load to increase the BFVel. Consequently, the onset of increase in the mBFvel measured in the SMA is related to an extended PC with mesentery involvement.

Our study demonstrates that changes in mBFvel measured in SMA and CT reflects the therapeutic effect of anti-tumoral drugs in mice with PC of ovarian origin. Indeed, the mean BFVel measured in the SMA of carboplatin-treated animals (7 ± 0.8 cm/s) with lower PCI (11 ± 3) was inferior than that of the non-treated mice with PC (11 ± 1 cm/s and IPC = 28 ± 6). Moreover we found a good correlation ($r=0.7$) between the BFVel measured in the SMA and the PCI. In addition, we found that the mBFvel in the CT of the same carboplatin-treated animals was inferior to that of non-treated animals (7.82 ± 1.09 cm/s vs. 15.05 ± 0.86 cm/s), with a moderate to good correlation ($r=0.56$). These latter results may be related to PC progression in the upper abdomen with implants on the surface of the liver, stomach, spleen and upper duodenum. Consequently the combination of Doppler US of the SMA and CT could allow distinguishing between mice with PC restricted to the mesentery and those with extension beyond the mesocolon.

The results of immunofluorescence staining Ki 67 and CD31 indicate that carboplatin has anti-proliferative and consecutive and subsequent anti-angiogenic effects on peritoneal nodules of ovarian origin. These results along with the decrease of PCI in carboplatin-treated mice reflecting PC extension within the abdomen and nodules' size confirm our hypothesis. Hemodynamic changes in the feeding arteries of abdominal organs seem to reflect the ongoing expansion of the tumoral vascular network grafted on abdominal organs. The decrease of mBFVel in the SMA and CT are associated with a decrease of tumor proliferation as assessed by Ki 67 staining, thus with a decrease of metabolic needs. Similarly the decrease of vascular density within the tumor may explain the decrease of the mBFVel. Indeed, decrease of vascular bed is responsible of an increase in local hemodynamic resistance that limits the circulatory velocity increase in the upstream native conduit artery [129, 130].

These results confirm our hypothesis that PC progression is linked to an angiogenesis and cell proliferation that increases the tumor vascular bed and the tumoral metabolic demand, that result in an increase of the upstream afferent artery's blood flow [129, 130, 136, 138].

Analysis of the Doppler recordings in the SMA of patients with PMP allows with success the monitoring of surgical treatment. Further studies must now be underwent in woman with peritoneal carcinomatosis of ovarian origin in order to explore the potential use of SMA and CT Doppler US recordings for the monitoring of pharmacological and surgical treatments.. More precisely, Doppler ultrasound of the TC and SMA could be a valuable imaging tool in clinical routine to screen for patients with PC of ovarian origin and mutation of the genes Breast Cancer 1 or 2 (*BRCA 1&2*) with good tumor response to carboplatin. Currently, those patients may benefit from olaparib, an anti-poly-(ADP ribose) polymerase 1 (PARP-1) treatment [139, 140]. Doppler US could thus be a non-invasive and robust tool to longitudinally monitor the antitumor effect of Carboplatin

Tables

Table 1. Results after 4 weeks of treatment

Group	Weight	PCI	mBFVel in SMA	mBFVel in CT
Group 1 Untreated ID8-Luc/C57B6	27.7± 0.5	28.2 ± 6.2	10.7± 0.6	15.1± 0.86
Group 2 Bevacizumab ID8-Luc/C57B6	27.6 ± 0.6	26.1 ± 3.6	10± 0.78	14.4± 1.1
Group 3 Carboplatin ID8-Luc/C57B6	23.3 ± 0.59	10.8 ± 3.3	7 ± 0.8	7.8± 1.1
Group 4 Healthy (C57B6)	21.8± 0.6	26.1 ± 3.6	7.2± 0.8	10.5± 1.1

Note. PCI means peritoneal carcinomatosis index; BFVel means mean Blood Flow Velocity;

BFVel is in cm/s; Weight is expressed in grams

Figures

Figure 1. Bioluminescence imaging of C57B6 mouse with intraperitoneal injection of ID8-Luc cells at 4 (A) and 6 weeks (B).

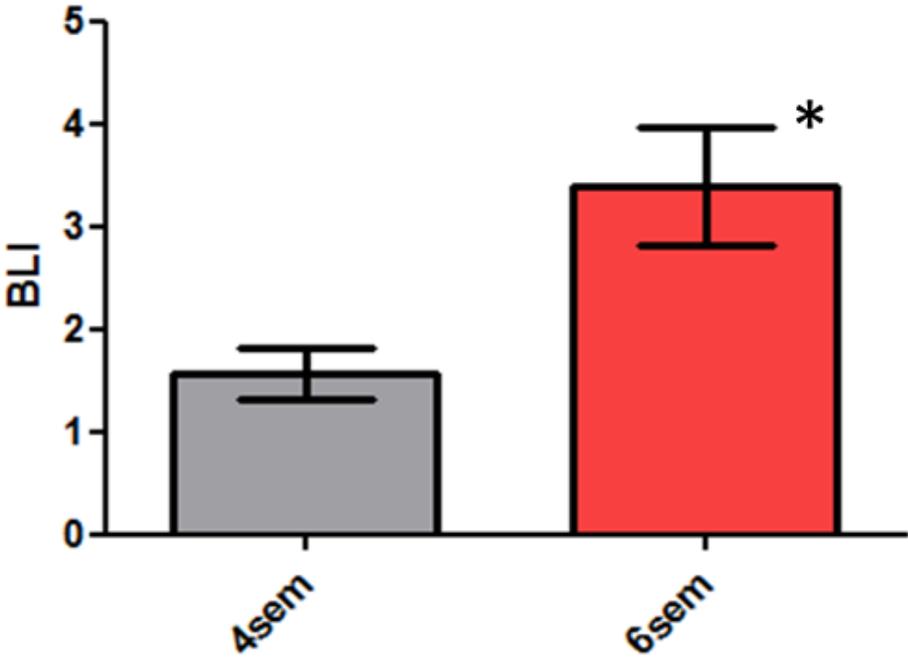
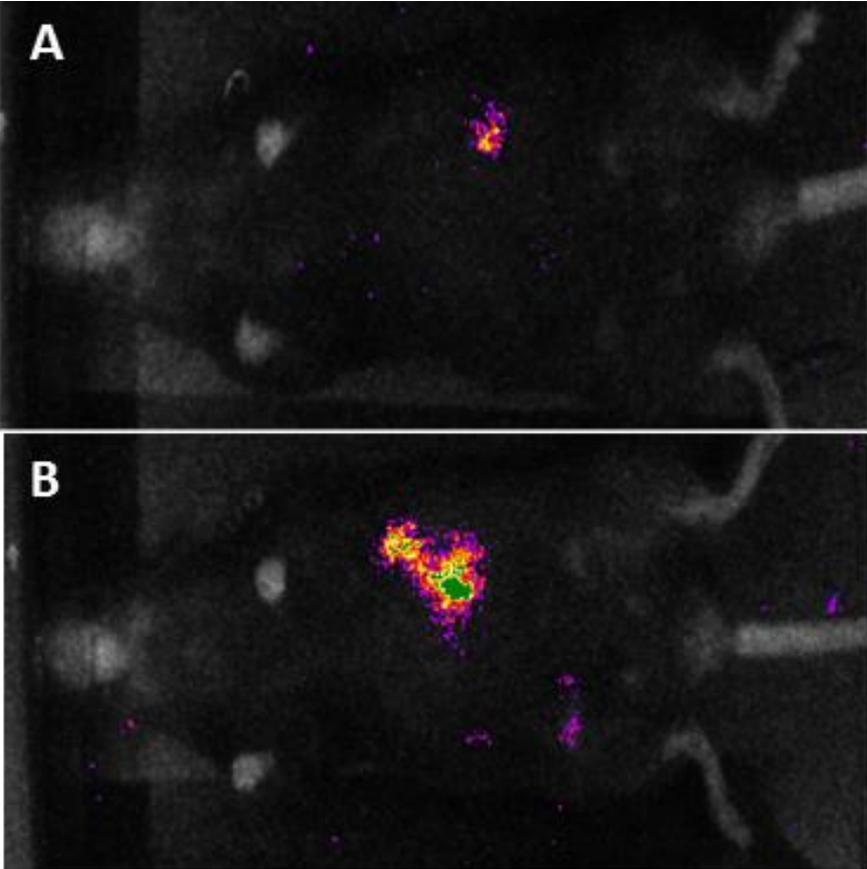


Figure 2. Planning of the experiment.

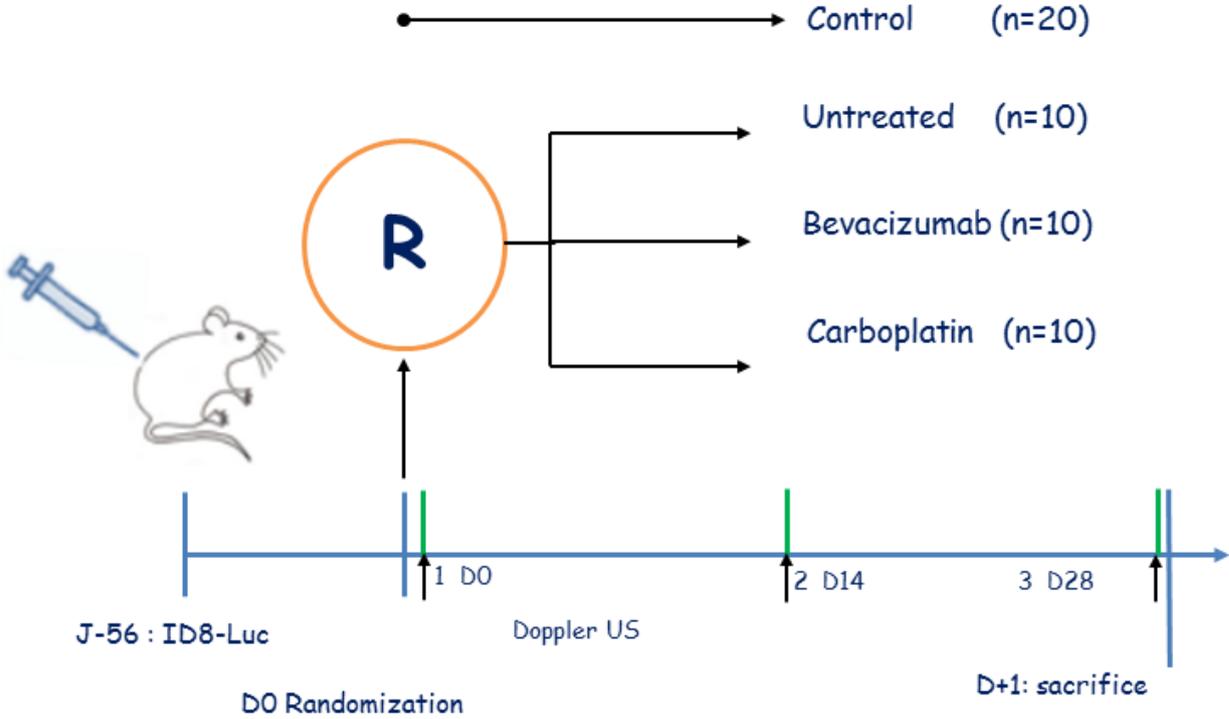


Figure 3. Gross photograph of peritoneum and mesentery of a ID8-Luc/C57Bl6 mouse with peritoneal carcinomatosis implants and hemorrhagic ascites.

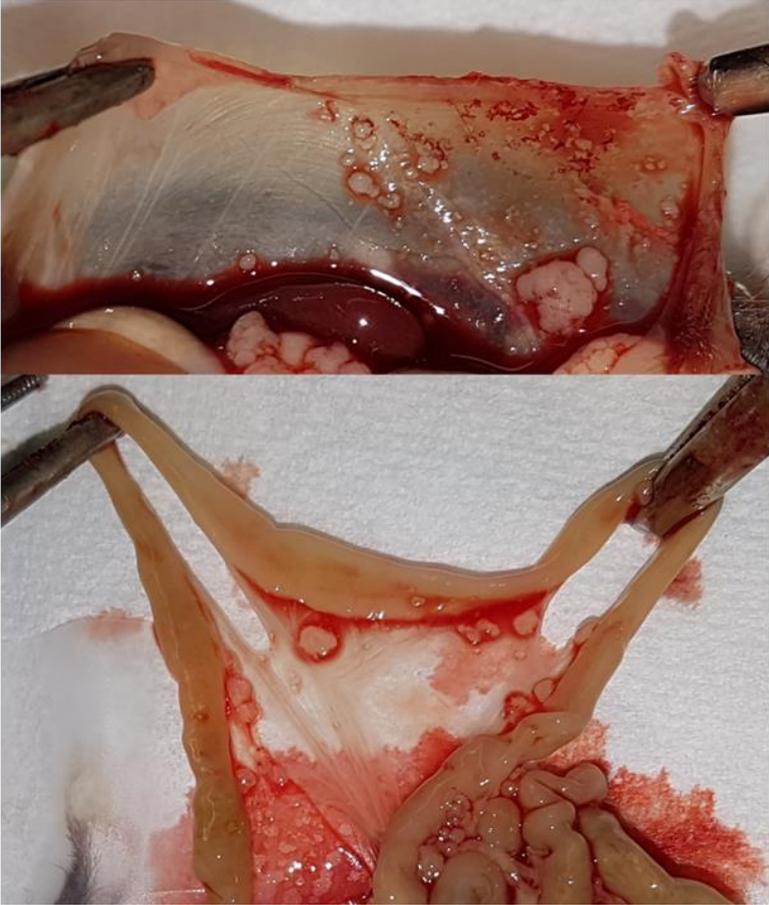


Figure 4. Mean Blood Flow velocity in the SMA at 8, 10 and 12 weeks.

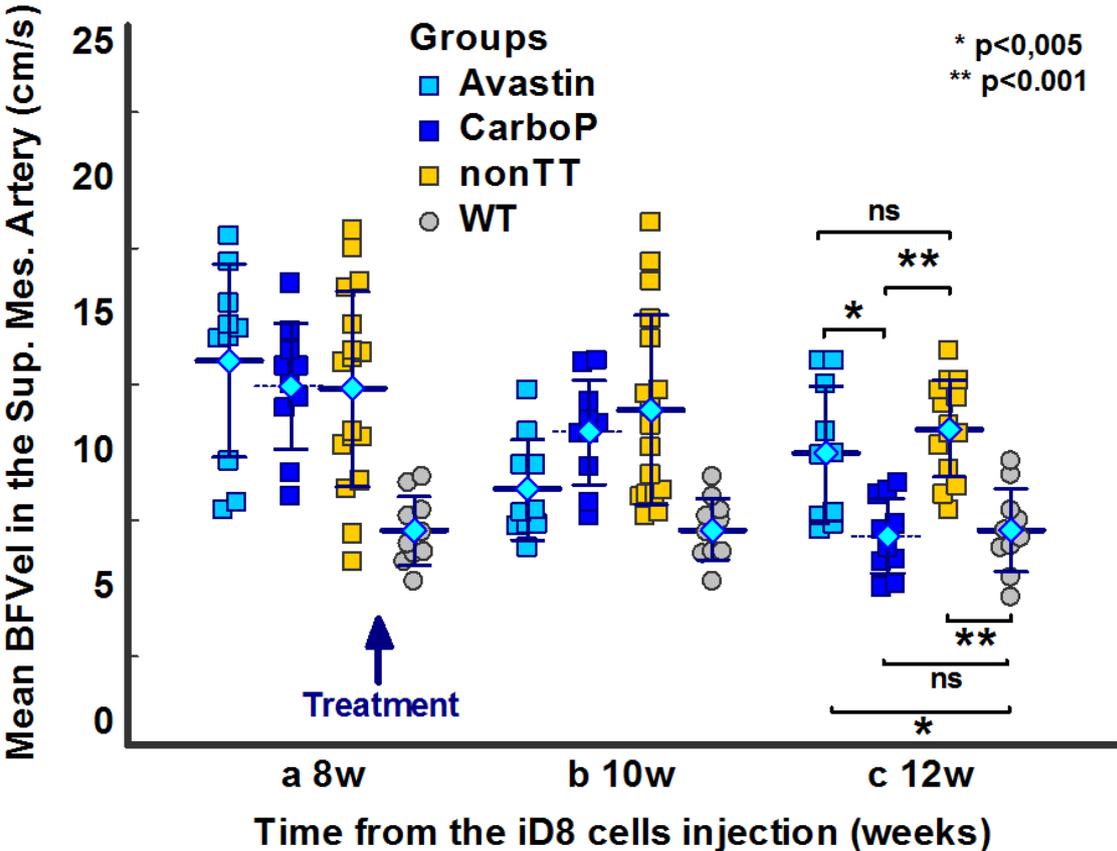


Figure 5. Correlation between mBFVel in the SMA and PCI.

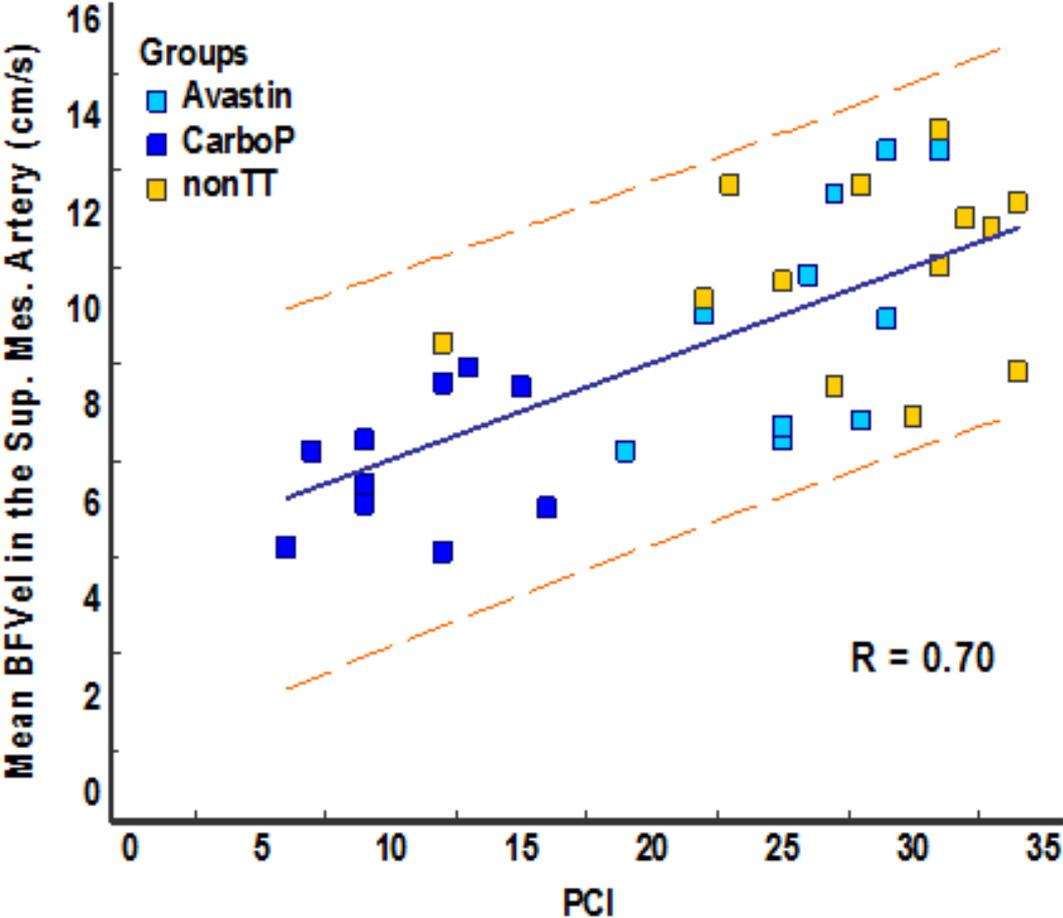


Figure 6. Correlation between mBFV_{el} in the SMA and mesenteric PCI.

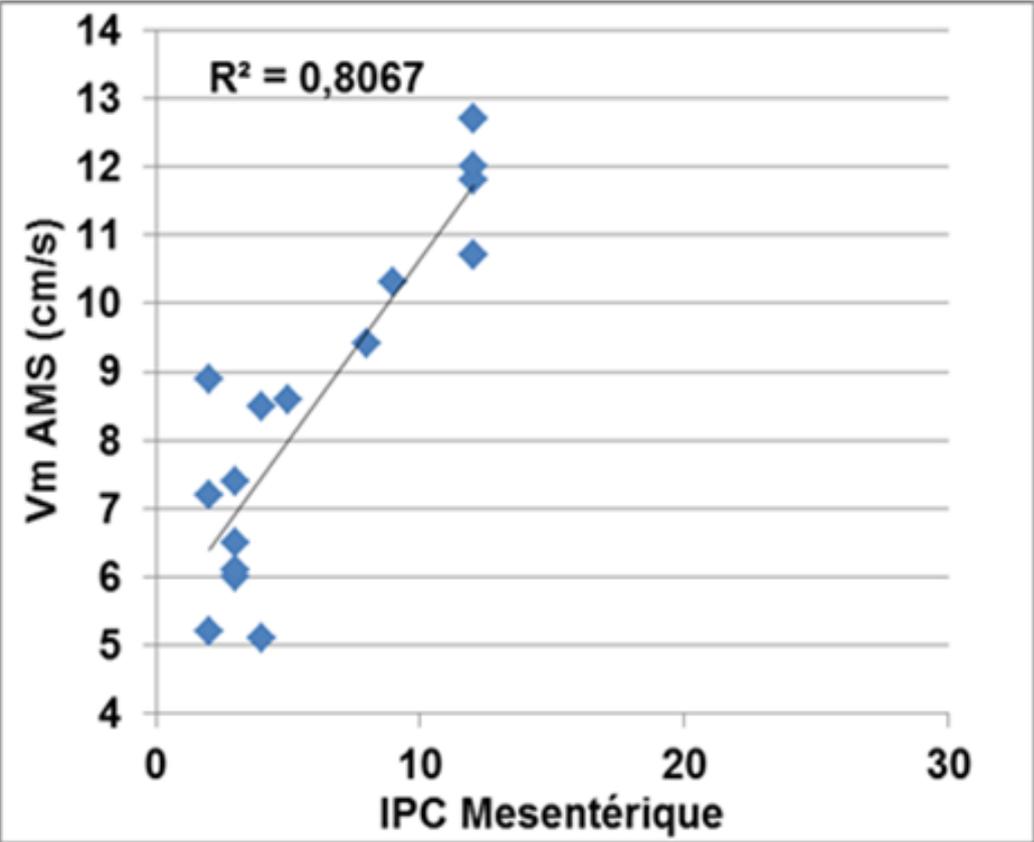
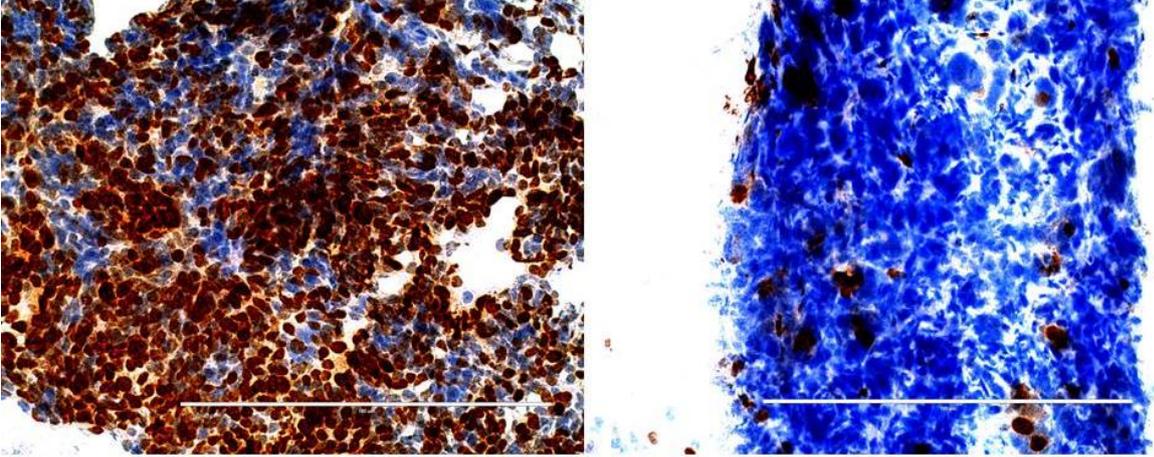
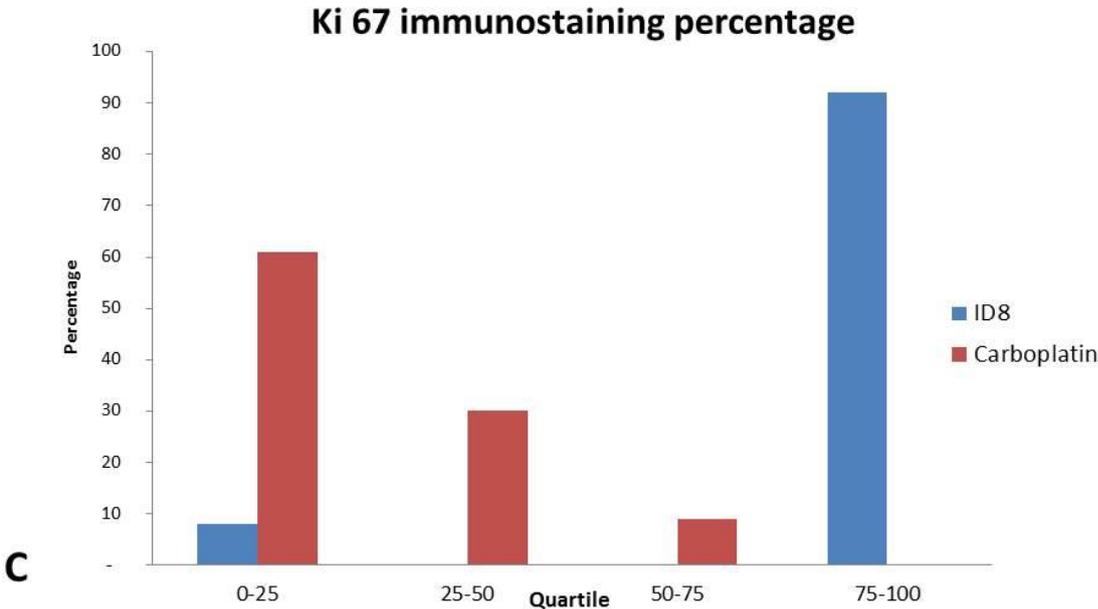


Figure 7. Ki67 immunostaining of the peritoneal nodules after 4 weeks of treatment in control untreated mice (A), and carboplatin-treated mice (B). The percentage of positive Ki67 cells was considerably decreased in carboplatin-treated mice versus untreated (p, 0.001) mice (C).**



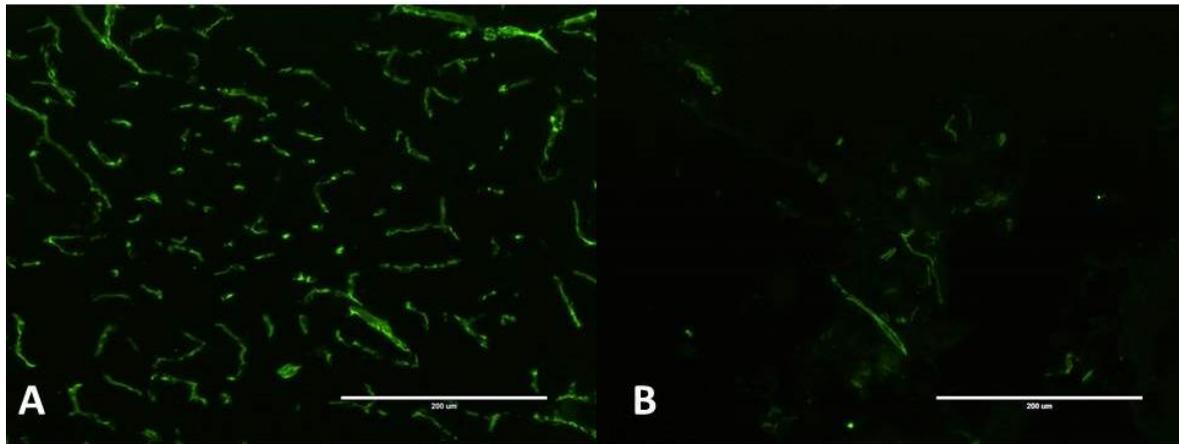
A

B



C

Figure 8. CD31 immunostaining of a peritoneal nodule in control untreated mice (A), and carboplatin-treated mice (B), (x20). Microvascular density decreased considerably in the carboplatin-treated compared with untreated mice, as assessed by the number of microvessels or vascular surface area.



3.4.3 Etude ancillaire

Mesure des débits et des vitesses sanguines moyennes chez des patientes avec une masse ovarienne et une suspicion de carcinose péritonéale.

Objectif :

Vérifier les données précliniques concernant les modifications hémodynamiques dans l'artère mésentérique supérieure (AMS) de patientes avec carcinose péritonéale d'origine ovarienne.

Mesurer les débits dans l'AMS de patientes avec une suspicion de carcinose péritonéale d'origine ovarienne et corrélérer les résultats à l'extension de la maladie en chirurgie.

Matériel et méthodes :

Vingt-trois patientes de 58.3 ± 13.7 ans [min – max : 30 – 76 ans] avec une masse ovarienne suspecte, et une suspicion de carcinose péritonéale sur un scanner préopératoire ont eu une échographie Doppler de l'AMS avec mesure du débit artériel 44 ± 69 jours [min – max : 0– 173 jours] avant la chirurgie. Toutes les patientes ont eu une évaluation de l'ICP lors de la chirurgie. Les résultats de l'échographie Doppler ont été corrélés à l'ICP.

Résultats :

Les caractéristiques des patientes sont présentées dans le tableau 1 et les résultats de la chirurgie et de l'échographie Doppler dans le tableau 2.

Au total, 2 patientes (2/23 ; 8,7%) avaient une tumeur borderline sans carcinose péritonéale, 4 patientes (4/23 ; 17,4%) avaient un cystadénocarcinome séreux et 18 patientes un cystadénocarcinome mucineux (18/23 ; 73,8%). L'ICP moyen était de 13 ± 13 [min – max : 0 – 39] avec en moyenne 5 ± 5 régions touchées [min – max : 0 – 13]. Les vitesses

moyennes et les débits étaient élevés avec respectivement 26.8 ± 13.9 cm/s [min – max : 9,1 – 75,9 cm/s] et 344.5 ± 129.4 ml/s [min – max : 124.9 – 543.7 ml/s]. Il existait une très bonne corrélation entre le débit et l'ICP avec $r = 0,81$ (Figure 1).

Conclusion :

Les vitesses et les débits étaient augmentés chez les patientes avec carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Le débit semble indicatif de l'étendue de la carcinose péritonéale.

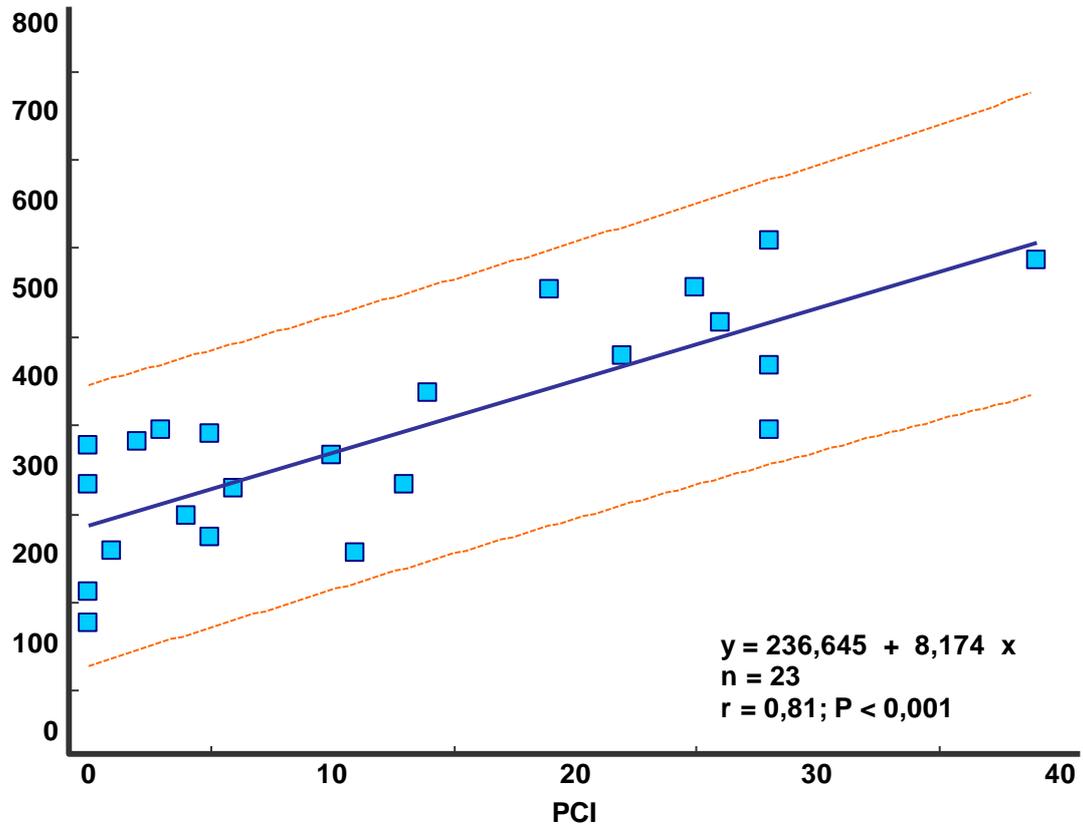
Tableau 1. Caractéristiques des patientes.

	Age <i>(en années)</i>	CA 125 <i>(en U/ml)</i>	Délai Doppler/chirurgie <i>(en jours)</i>
Résultats	58,3 ± 13,7 [30 – 76]	379,2 ± 571,7 [0 – 1676]	44 ± 69 [0– 173]

Tableau 2. Résultats de l'échographie Doppler et de la chirurgie

	mBFVol <i>(en ml/min)</i>	mBFVel <i>(en cm/s)</i>	ICP	Nb de régions touchées
Résultats	344,5 ± 129,4 [124,9 – 543,7]	26.8 ± 13.9 [9,1 – 75,9]	13 ± 13 [0 – 39]	5 ± 5 [0 – 13]

Figure 1. Corrélation entre le débit et l'ICP.



4. PARTIE 3 : DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION

Ce travail démontre qu'il existe une relation directe entre les modifications dynamiques du lit vasculaire d'une tumeur et les grandeurs hémodynamiques de l'artère afférente à l'organe sur lequel la tumeur se développe. Les modifications du lit vasculaire tumoral ont lieu à une échelle microscopique et il est aujourd'hui difficile d'avoir un marqueur fiable et reproductible in vivo en imagerie non invasive. Le remodelage vasculaire d'amont est une traduction macroscopique des phénomènes micro vasculaires tumoraux, et donc plus facilement détectable et mesurable.

En résumé, les forces de cisaillement exercées à l'interface sang/endothélium représentent une contrainte que le ventricule gauche doit surpasser pour assurer le débit. Cette contrainte est importante à l'étage artériolaire et constitue la résistance hémodynamique artériolaire c'est-à-dire un véritable barrage hémodynamique qui protège les capillaires d'une pression de type artérielle, donc d'une destruction et d'une fuite capillaire vers les tissus, maintenant la volémie, l'homéostasie du système circulatoire. Cette contrainte est beaucoup plus faible à l'étage artériel, le système artériel présentant ainsi une résistance hémodynamique faible qui doit cependant être « normalisée » pour diminuer au mieux le travail cardiaque. Pour ajuster les forces de cisaillement, l'artère adapte son diamètre circulant en fonction du débit sanguin, débit lui-même déterminé par la valeur de la résistance hémodynamique d'aval de l'organe irrigué (Loi de Poiseuille). La valeur de la résistance hémodynamique d'organe dépend essentiellement de la densité micro vasculaire d'organe. Ainsi, en cas de formation d'un lit micro vasculaire anormal surajouté, la résistance hémodynamique s'abaisse, le débit sanguin local s'élève, les vitesses circulatoires et les contraintes de cisaillement augmentent en l'absence d'adaptation de l'artère afférente. Pour ramener les contraintes de cisaillement à des niveaux physiologiques (8-10 dynes/cm²), l'artère est alors l'objet d'un *remodelage vasculaire expansif* consistant en

1) une vasodilatation, i.e. une augmentation de son diamètre circulant pour diminuer les vitesses circulatoires (donc les forces de cisaillement) tout en assurant un débit sanguin local augmenté,

2) une augmentation de l'épaisseur du vaisseau pour équilibrer les forces de tension pariétale exercées par l'augmentation du diamètre circulant (Loi de Laplace) [87, 141].

Ce remodelage artériel est assuré par des processus de destruction et reconstruction successifs des différentes couches de la paroi vasculaire. C'est un processus long qui s'établit sur plusieurs semaines/mois dans l'espèce humaine, plusieurs jours/semaines sur les modèles murins.

Inversement, en cas de diminution constante de débit sanguin local (ablation du lit micro vasculaire anormal par résection de tumeur ou d'organe), les contraintes de cisaillement sont également transitoirement modifiées, abaissées, et les mêmes processus biologiques interviennent dans la paroi artérielle pour aboutir à un *remodelage artériel régressif* avec diminution du diamètre circulant pour restaurer les niveaux de vitesses circulatoires (donc de contraintes de cisaillement).

Le retard entre l'adaptation de l'artère, son remodelage, et la croissance ou l'involution du lit vasculaire anormal néoformé d'aval définit donc un laps de temps pendant lequel les vitesses circulatoires et les forces de cisaillement dans l'artère afférente sont « désadaptées ». La constatation par leurs mesures de cette désadaptation constitue alors un moyen de mise en évidence de l'évolution en expansion ou en régression des lésions néoformées en aval. Le niveau du débit artériel dans l'artère afférente à la lésion renseignerait ainsi sur le « volume vasculaire » de la lésion tumorale, donc son volume, et les forces de cisaillement atteintes dans l'artère afférente renseigneraient alors sur l'évolutivité de la lésion tumorale, de façon prédictive, avant les modifications morphologiques radiologiques et cliniques.

Il existe cependant quelques limites à ce modèle qui s'appuie sur quelques approximations. Dans la formule de calcul de la force de cisaillement, nous avons considéré la viscosité comme une constante. Or, la viscosité peut varier dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Ainsi, la modification de la concentration volumique des cellules sanguines (polyglobulie, hyperleucocytose, thrombocytose), la modification de la viscosité du plasma (hyperfibrinogénémie, hyperglobulinémie, hyperprotidémie), la modification de la déformabilité des hématies (sénescence, drépanocytose) et de la température sont des facteurs qui influencent l'élévation de la viscosité du sang et donc l'augmentation des forces de cisaillement tangentielles appliquées à l'interface sang/endothélium [142]. Plus précisément, l'hématocrite semble être le paramètre le plus influent sur la viscosité du sang [143]. Les globules rouges ont en effet tendance à créer des agrégats (rouleaux) qui augmente la viscosité du sang. Cependant, ces rouleaux se désagrègent à vitesse élevée, et simultanément les globules rouges s'allongent dans la direction du flux. Ainsi, dans les artères de gros et de moyens calibre, les vitesses circulatoires maximales sont élevées (autour de 100 cm/s en systole) ; par conséquent la viscosité est 10 à 20 fois plus faible à l'étage artériel que dans les micro-vaisseaux et l'on parle alors de viscosité cinématique. Sa modification en fonction des concentrations en cellules sanguines et protéines plasmatiques présente alors un impact beaucoup plus modéré à l'étage artériel qu'à l'étage micro vasculaire. Ainsi, pour un « usage clinique » la viscosité peut être considérée comme constante dans les grosses artères (0,035 Poise) [144].

Enfin, les élévations de la viscosité sanguine sont surtout observées chez les patients porteurs d'une évolution de leur maladie, en récurrence, et, l'augmentation éventuelle de viscosité élèverait plus encore leurs valeurs de forces de cisaillement. Ceci participe ainsi à une minimisation de l'élévation des forces de cisaillement quand on utilise une viscosité constante avec la formule de calcul dans les artères afférentes aux

organes touchés comme l'artère mésentérique supérieure l'artère hématique ou les carotides et leurs premières branches, renforçant ainsi nos résultats [142–144].

Une seconde approximation est que le sang est considéré comme un fluide Newtonien, c'est-à-dire avec un écoulement stable et une viscosité dynamique constante quelle que soit les vitesses de circulation. Or, il est évident que la circulation sanguine est pulsatile et que comme nous venons de le voir, les hématies qui sont les déterminants majeurs de la viscosité sanguine ont un comportement différent à vitesse élevée et vitesse faible [145]. De même les variations de température et de concentrations en protéines plasmatiques (particulièrement le fibrinogène) influence les capacités d'agrégation des hématies pour différentes vitesses [142, 146]. Néanmoins, les modèles considérant le sang comme un fluide non Newtonien sont compliqués et peu utilisables en routine clinique.

Les études réalisées ici chez l'animal ne mesuraient que les vitesses circulatoires dans l'artère mésentérique supérieure et le tronc cœliaque. En effet, la résolution de l'échographe était insuffisante pour mesurer de manière fiable et reproductible les variations du diamètre des vaisseaux d'intérêt. En expérimentation sur le petit animal, nous ne pouvions donc mesurer que les vitesses circulatoires afin d'évaluer l'évolution (i.e. stabilité, expansion ou involution) des lits vasculaires anormaux d'aval. En revanche, en clinique humaine, nous avons la possibilité de mesurer les diamètres circulants et les vitesses circulatoires afin de calculer les débits de perfusion d'organe et les forces de cisaillement. Ceci nous a donc permis de mettre en évidence le concept d'un déphasage temporel entre le remodelage vasculaire de l'artère en amont d'un lit vasculaire d'aval anormal et les modifications du « volume » du lit vasculaire anormal afin d'évaluer l'évolutivité des lésions tumorales, aussi bien sur des MAVS que sur des carcinoses péritonéales. Comme les vitesses circulatoires varient dans le même sens que celles des forces de cisaillement et avec une sensibilité et une

spécificité voisine, il est possible de valider tous les résultats obtenus sur le petit animal à partir des observations faites en pathologie humaine.

Le phénomène de remodelage artériel expansif ou régressif et le déphasage temporel par rapport à l'évolution, indépendante, du lit vasculaire d'aval sont des concepts nouveaux qui semblent ubiquitaires (**Figures 18 & 19**). Son utilisation à des fins diagnostiques et pronostiques est probablement transposable à d'autres situations cliniques où un lit capillaire subit des modifications de nature (apparition de shunts) ou de taille (expansion ou régression). (**Voir annexes 1 & 2**).

La preuve de concept est faite, il reste bien sûr à réaliser des essais cliniques bien conduits pour apporter la « preuve clinique » aussi bien sur les MAVS que sur les carcinoses péritonéales, voire d'autres lésions à pouvoir angiogénique.

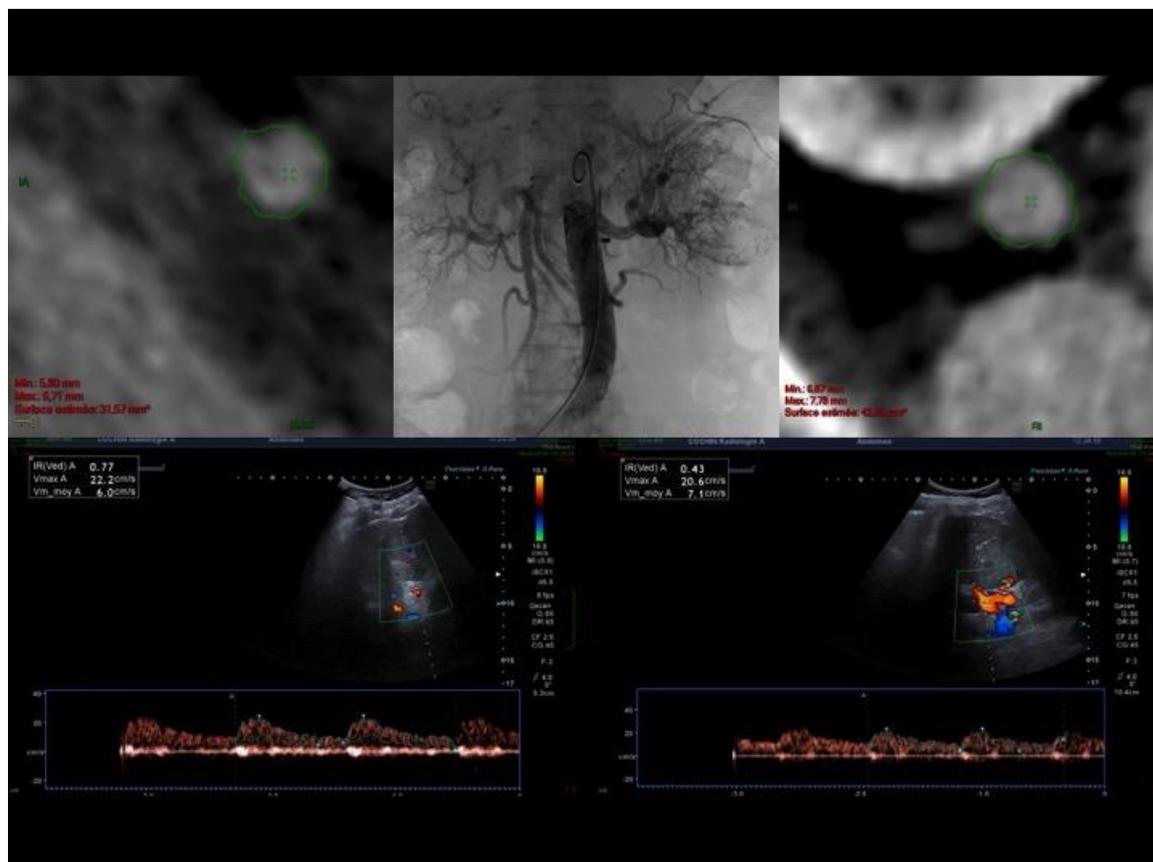
Une autre limite de la technique est liée à la méthode de mesure par échographie Doppler. En effet, seuls les vaisseaux facilement accessibles peuvent être examinés. Ainsi, les vaisseaux profonds, peuvent être cachés par des interfaces aériques ou osseuses, ou bien encore les patients peuvent être obèses, rendant difficile l'utilisation de l'échographie Doppler.

C'est pourquoi l'utilisation de l'IRM en contraste de phase pourrait être un outil performant et intéressant pour palier à ces limites. L'IRM permet d'avoir accès à tous les vaisseaux du corps humain, n'est pas perturbé par les interfaces aériques ou osseuses, est reproductible et la séquence d'acquisition dure 30-90sec ce qui permet d'être intégré en routine clinique assez aisément (**Voir Annexe 3**). L'IRM en contraste de phase pourrait constituer une perspective intéressante d'étude des remodelages vasculaires tumoraux.

ANNEXES

Annexe 1

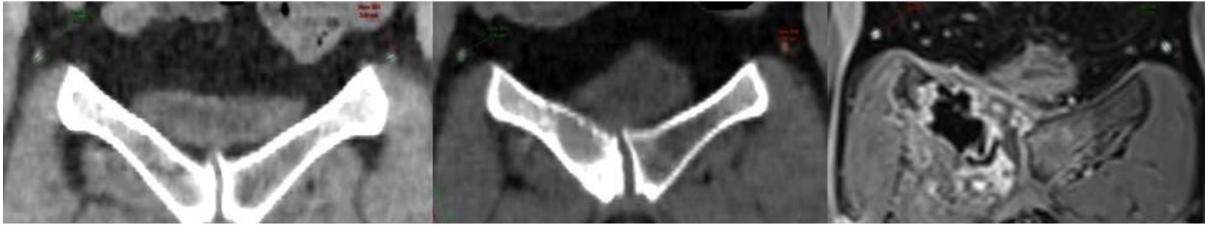
Patiente de 40 ans avec une tumeur rénale droite de 10cm.



Asymétrie de diamètre de l'artère rénale du côté de la tumeur et des vitesses moyennes identiques : 6cm/s à droite et 7,1cm/s à gauche. En revanche les débits du côté pathologique sont franchement augmentés : à droite 189,4 ml/s, à gauche 302,8 ml/s. Ces résultats sont en faveur d'une tumeur large, lentement évolutive.

Annexe 2 :

Patiente de 65 ans avec une métastase de cancer de la thyroïde dans la branche ilio-pubienne droite.



Artères pudendales internes symétriques avant l'apparition d'une métastase de cancer de la thyroïde dans la branche ilio-pubienne droite. Secondairement, l'artère pudendale interne droite s'hypertrophie (passant 3 à 3.5mm) puis revient à un calibre normal après embolisation et cimentoplastie de la lésion.

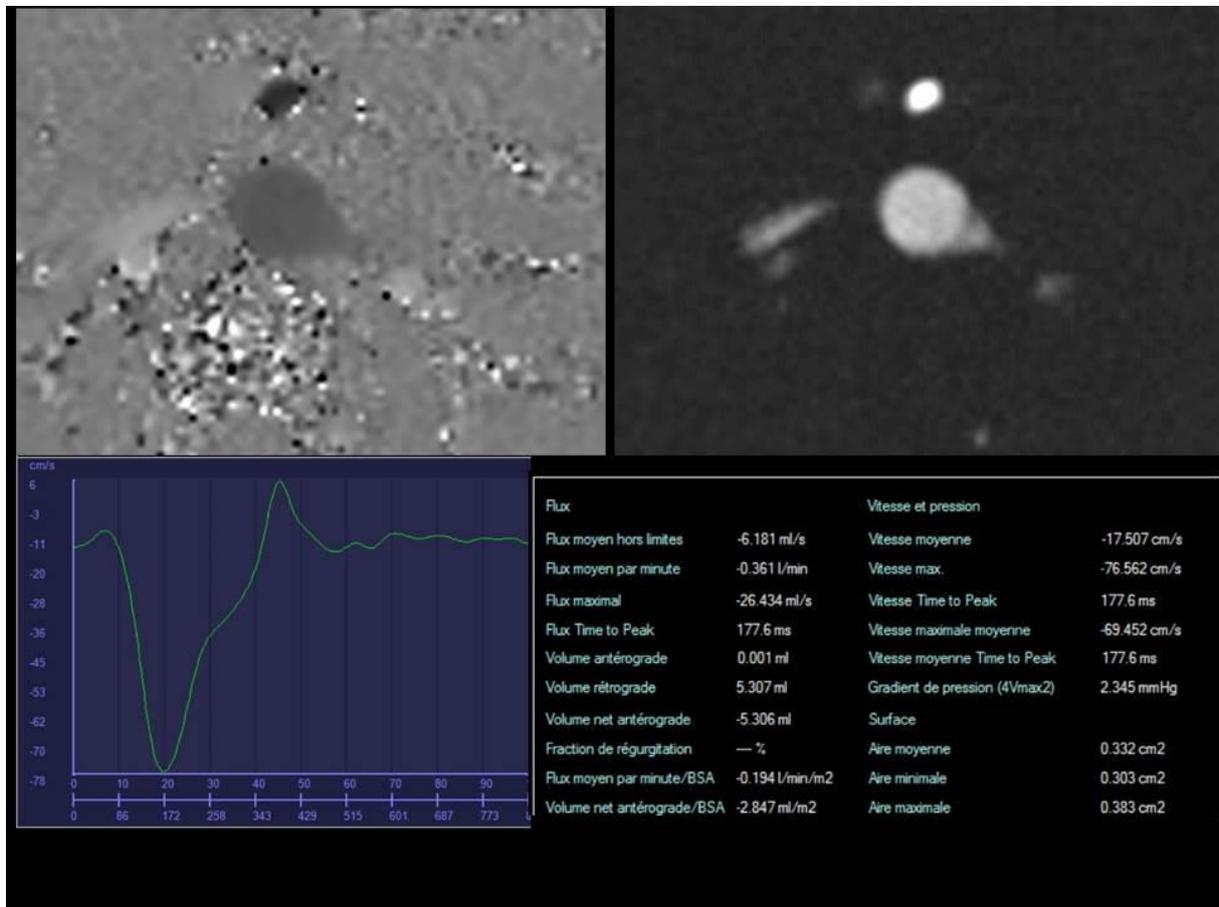
Patiente de 72 ans avec une métastase trochantéro-diaphysaire fémorale gauche de cancer du rein.



(A) Hypertrophie de la branche descendante de l'artère circonflexe fémorale gauche en comparaison de l'artère à droite (*flèches blanches*). (B) retour veineux précoce par les veines fémorales profondes à gauche illustrant l'existence de fistules artérioveineuses intra tumorales (*flèches noire*).

Annexe 3 :

Patient avec pseudomyxome péritonéal surveillé par IRM en contraste de phase de l'artère mésentérique.



Mesure du débit mésentérique estimé en échographie à 317ml/s et 361 ml/s en IRM.

RÉFÉRENCES

1. Aird WC (2011) Discovery of the cardiovascular system: from Galen to William Harvey. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1:118–129. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04312.x>
2. Boylan M (2007) Galen: on blood, the pulse, and the arteries. *J Hist Biol* 40:207–230
3. Sternbach GL, Varon J, Fromm RE, et al (2001) Galen and the origins of artificial ventilation, the arteries and the pulse. *Resuscitation* 49:119–122
4. Limet R (2010) [From Hippocrates to Harvey: twenty centuries of research on circulation]. *Rev Med Liege* 65:562–568
5. Brown A, Barnes J (1994) William Harvey (1578-1657) and Marcello Malpighi (1628-1694): linked in blood, paralleled in life. *Adler Mus Bull* 20:14–23
6. Lenzi P, Bocci G, Natale G (2016) John Hunter and the origin of the term “angiogenesis.” *Angiogenesis* 19:255–256. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9496-7>
7. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391–400. <https://doi.org/10.1038/nrd1381>
8. Algire GH, Chalkley HW, Earle WE, et al (1950) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. III. Vascular reactions’ of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* 11:555–580
9. Hartnett ME (2010) Studies on the Pathogenesis of Avascular Retina and Neovascularization into the Vitreous in Peripheral Severe Retinopathy of Prematurity (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 108:96–119
10. Lee A, Langer R (1983) Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 221:1185–1187
11. Silvestre J-S, Smadja DM, Lévy BI (2013) Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev* 93:1743–1802. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2013>
12. Zlatanova I, Pinto C, Bonnin P, et al (2019) Iron Regulator Heparin Impairs Macrophage-Dependent Cardiac Repair After Injury. *Circulation* 139:1530–1547. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034545>
13. Schaper W, Ito WD (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79:911–919
14. Helisch A, Schaper W (2003) Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 10:83–97. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800173>

15. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
16. Olcina MM, Leszczynska KB, Senra JM, et al (2016) H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. *Oncogene* 35:793–799. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.134>
17. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
18. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105:659–669. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2958>
19. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996) How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69:135–174
20. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
21. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284:1994–1998
22. Yue PYK, Mak NK, Cheng YK, et al (2007) Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med* 2:6. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-2-6>
23. Short RHD (1950) Alveolar epithelium in relation to growth of the lung. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 235:35–86. <https://doi.org/10.1098/rstb.1950.0014>
24. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V (2004) Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231:474–488. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20184>
25. Patan S, Tanda S, Roberge S, et al (2001) Vascular morphogenesis and remodeling in a human tumor xenograft: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation. *Circ Res* 89:732–739
26. Patan S, Munn LL, Jain RK (1996) Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 51:260–272. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0025>
27. Djonov V, Baum O, Burri PH (2003) Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314:107–117. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0784-3>
28. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, et al (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170:1–15. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060302>
29. McDonald DM, Choyke PL (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9:713–725. <https://doi.org/10.1038/nm0603-713>

30. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177–182
31. Boucher Y, Jain RK (1992) Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res* 52:5110–5114
32. Boucher Y, Leunig M, Jain RK (1996) Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. *Cancer Res* 56:4264–4266
33. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M (2001) Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18:243–259. <https://doi.org/10.1385/MO:18:4:243>
34. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A (1981) Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 47:207–214
35. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45:228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
36. Fournier L, Ammari S, Thiam R, Cuénod C-A (2014) Imaging criteria for assessing tumour response: RECIST, mRECIST, Cheson. *Diagn Interv Imaging* 95:689–703. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2014.05.002>
37. Nishino M, Jagannathan JP, Krajewski KM, et al (2012) Personalized tumor response assessment in the era of molecular medicine: cancer-specific and therapy-specific response criteria to complement pitfalls of RECIST. *AJR Am J Roentgenol* 198:737–745. <https://doi.org/10.2214/AJR.11.7483>
38. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, et al (2007) Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* 25:1753–1759. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.3049>
39. Benjamin RS, Choi H, Macapinlac HA, et al (2007) We should desist using RECIST, at least in GIST. *J Clin Oncol* 25:1760–1764. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.3411>
40. Krajewski KM, Guo M, Van den Abbeele AD, et al (2011) Comparison of four early posttherapy imaging changes (EPTIC; RECIST 1.0, tumor shrinkage, computed tomography tumor density, Choi criteria) in assessing outcome to vascular endothelial growth factor-targeted therapy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol* 59:856–862. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.01.038>
41. Schmidt N, Hess V, Zumbunn T, et al (2013) Choi response criteria for prediction of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with anti-angiogenic therapies. *Eur Radiol* 23:632–639. <https://doi.org/10.1007/s00330-012-2640-x>
42. van der Veldt A a. M, Meijerink MR, van den Eertwegh AJM, et al (2010) Choi response criteria for early prediction of clinical outcome in patients with metastatic

renal cell cancer treated with sunitinib. *Br J Cancer* 102:803–809.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605567>

43. Smith AD, Lieber ML, Shah SN (2010) Assessing tumor response and detecting recurrence in metastatic renal cell carcinoma on targeted therapy: importance of size and attenuation on contrast-enhanced CT. *AJR Am J Roentgenol* 194:157–165.
<https://doi.org/10.2214/AJR.09.2941>
44. Smith AD, Shah SN, Rini BI, et al (2010) Morphology, Attenuation, Size, and Structure (MASS) criteria: assessing response and predicting clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma on antiangiogenic targeted therapy. *AJR Am J Roentgenol* 194:1470–1478. <https://doi.org/10.2214/AJR.09.3456>
45. Cartier V, Aubé C (2014) Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Diagn Interv Imaging* 95:709–719. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2014.06.004>
46. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer (2012) EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 56:908–943.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
47. Buell TJ, Ding D, Starke RM, et al (2014) Embolization-induced angiogenesis in cerebral arteriovenous malformations. *J Clin Neurosci* 21:1866–1871.
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.04.010>
48. Uller W, Alomari AI, Richter GT (2014) Arteriovenous malformations. *Semin Pediatr Surg* 23:203–207. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.07.005>
49. Esquivel J, Chua TC, Stojadinovic A, et al (2010) Accuracy and clinical relevance of computed tomography scan interpretation of peritoneal cancer index in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis: a multi-institutional study. *J Surg Oncol* 102:565–570. <https://doi.org/10.1002/jso.21601>
50. Jacquet P, Sugarbaker PH (1996) Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 82:359–374
51. de Bree E, Koops W, Kröger R, et al (2004) Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver agreement. *J Surg Oncol* 86:64–73.
<https://doi.org/10.1002/jso.20049>
52. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, et al (2008) Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging* 33:87–93.
<https://doi.org/10.1007/s00261-007-9211-7>
53. Schmidt S, Meuli RA, Achari C, Prior JO (2015) Peritoneal carcinomatosis in primary ovarian cancer staging: comparison between MDCT, MRI, and 18F-FDG PET/CT. *Clin Nucl Med* 40:371–377.
<https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000000768>

54. Coakley FV, Choi PH, Gougoutas CA, et al (2002) Peritoneal metastases: detection with spiral CT in patients with ovarian cancer. *Radiology* 223:495–499. <https://doi.org/10.1148/radiol.2232011081>
55. Marin D, Catalano C, Baski M, et al (2010) 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging* 35:694–700. <https://doi.org/10.1007/s00261-008-9464-9>
56. Low RN, Barone RM, Lucero J (2015) Comparison of MRI and CT for predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures. *Ann Surg Oncol* 22:1708–1715. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4041-7>
57. Torkzad MR, Casta N, Bergman A, et al (2015) Comparison between MRI and CT in prediction of peritoneal carcinomatosis index (PCI) in patients undergoing cytoreductive surgery in relation to the experience of the radiologist. *J Surg Oncol* 111:746–751. <https://doi.org/10.1002/jso.23878>
58. Menassel B, Duclos A, Passot G, et al (2016) Preoperative CT and MRI prediction of non-resectability in patients treated for pseudomyxoma peritonei from mucinous appendiceal neoplasms. *Eur J Surg Oncol* 42:558–566. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.01.005>
59. Bonnin P (2019) Référentiels des cours de Physiologie cardiovasculaire du CFEUPS (Collège Français des Enseignants Universitaires de Physiologie en Santé)
60. Papaioannou TG, Stefanadis C (2005) Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* 46:9–15
61. Levesque MJ, Nerem RM (1985) The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 107:341–347
62. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376
63. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109–142
64. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE (1998) In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273:34724–34729. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34724>
65. Rapoport RM, Murad F (1983) Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 9:281–296
66. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL (1985) Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227:1477–1479

67. Bhagyalakshmi A, Frangos JA (1989) Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:31–37
68. Taubman MB, Berk BC, Izumo S, et al (1989) Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J Biol Chem* 264:526–530
69. Tsuda T, Alexander RW (1990) Angiotensin II stimulates phosphorylation of nuclear lamins via a protein kinase C-dependent mechanism in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 265:1165–1170
70. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T (1989) Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13:305–314
71. Lee RM, Owens GK, Scott-Burden T, et al (1995) Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 73:574–584
72. Vigne P, Marsault R, Breittmayer JP, Frelin C (1990) Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* 266:415–420. <https://doi.org/10.1042/bj2660415>
73. Kaul S, Cercek B, Rengstrom J, et al (2000) Polymeric-based perivascular delivery of a nitric oxide donor inhibits intimal thickening after balloon denudation arterial injury: role of nuclear factor-kappaB. *J Am Coll Cardiol* 35:493–501
74. Shears LL, Kawaharada N, Tzeng E, et al (1997) Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. *J Clin Invest* 100:2035–2042. <https://doi.org/10.1172/JCI119736>
75. Scott-Burden T, Vanhoutte PM (1994) Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 21:91–97
76. Garg UC, Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1774–1777. <https://doi.org/10.1172/JCI114081>
77. Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, et al (1996) Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ Res* 79:857–863
78. Wolinsky H, Glagov S (1964) STRUCTURAL BASIS FOR THE STATIC MECHANICAL PROPERTIES OF THE AORTIC MEDIA. *Circ Res* 14:400–413
79. Potard US, Butler JP, Wang N (1997) Cytoskeletal mechanics in confluent epithelial cells probed through integrins and E-cadherins. *Am J Physiol* 272:C1654-1663. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.5.C1654>
80. Leung DY, Glagov S, Mathews MB (1977) Elastin and collagen accumulation in rabbit ascending aorta and pulmonary trunk during postnatal growth. Correlation of cellular synthetic response with medial tension. *Circ Res* 41:316–323

81. Bomberger RA, Zarins CK, Taylor KE, Glagov S (1980) Effect of hypotension on atherogenesis and aortic wall composition. *J Surg Res* 28:402–409
82. Lie M, Sejersted OM, Kiil F (1970) Local regulation of vascular cross section during changes in femoral arterial blood flow in dogs. *Circ Res* 27:727–737
83. Langille BL, O'Donnell F (1986) Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231:405–407
84. Langille BL, Bendeck MP, Keeley FW (1989) Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. *Am J Physiol* 256:H931-939. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.256.4.H931>
85. Guyton JR, Hartley CJ (1985) Flow restriction of one carotid artery in juvenile rats inhibits growth of arterial diameter. *Am J Physiol* 248:H540-546. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.248.4.H540>
86. Kamiya A, Togawa T (1980) Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 239:H14-21. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1980.239.1.H14>
87. Tronc F, Wassef M, Esposito B, et al (1996) Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1256–1262
88. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, et al (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269:C1371-1378. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1371>
89. Miller VM, Vanhoutte PM (1988) Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *Am J Physiol* 255:H446-451. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.255.3.H446>
90. Davies PF, Robotewskyj A, Griem ML (1994) Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *J Clin Invest* 93:2031–2038. <https://doi.org/10.1172/JCI117197>
91. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF (1988) Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 331:168–170. <https://doi.org/10.1038/331168a0>
92. Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, et al (1991) Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88:1663–1671. <https://doi.org/10.1172/JCI115481>
93. Li Y-SJ, Haga JH, Chien S (2005) Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38:1949–1971. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.09.030>
94. Makanya AN, Stauffer D, Ribatti D, et al (2005) Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: the interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. *Microsc Res Tech* 66:275–288. <https://doi.org/10.1002/jemt.20169>

95. Hainaud P, Contrerès J-O, Villemain A, et al (2006) The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res* 66:8501–8510. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4226>
96. Donald I, Macvicar J, Brown TG (1958) Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. *Lancet* 1:1188–1195
97. Coman IM, Popescu BA (2015) Shigeo Satomura: 60 years of Doppler ultrasound in medicine. *Cardiovasc Ultrasound* 13:. <https://doi.org/10.1186/s12947-015-0042-3>
98. Grataloup-Oriez C, Charpentier A (1999) Principes et techniques de l'échographie-dopple. In: *Encyclopédie médicochirurgicale*
99. Caroff J, Bière L, Trebuchet G, et al (2012) Applications of phase-contrast velocimetry sequences in cardiovascular imaging. *Diagn Interv Imaging* 93:159–170. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2012.01.008>
100. Lotz J, Meier C, Leppert A, Galanski M (2002) Cardiovascular flow measurement with phase-contrast MR imaging: basic facts and implementation. *Radiographics* 22:651–671. <https://doi.org/10.1148/radiographics.22.3.g02ma11651>
101. Schoenberg SO, Knopp MV, Bock M, et al (1997) Renal artery stenosis: grading of hemodynamic changes with cine phase-contrast MR blood flow measurements. *Radiology* 203:45–53. <https://doi.org/10.1148/radiology.203.1.9122415>
102. Silverman JM, Raissi S, Tyszka JM, et al (2000) Phase-contrast cine MR angiography detection of thoracic aortic dissection. *Int J Card Imaging* 16:461–470
103. Yildiz S, Thyagaraj S, Jin N, et al (2017) Quantifying the influence of respiration and cardiac pulsations on cerebrospinal fluid dynamics using real-time phase-contrast MRI. *J Magn Reson Imaging* 46:431–439. <https://doi.org/10.1002/jmri.25591>
104. Yzet T, Bouzerar R, Baledent O, et al (2010) Dynamic measurements of total hepatic blood flow with Phase Contrast MRI. *Eur J Radiol* 73:119–124. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.09.032>
105. Yzet T, Bouzerar R, Allart J-D, et al (2010) Hepatic vascular flow measurements by phase contrast MRI and doppler echography: a comparative and reproducibility study. *J Magn Reson Imaging* 31:579–588. <https://doi.org/10.1002/jmri.22079>
106. Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, et al (2012) Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy* 32:1095–1111. <https://doi.org/10.1002/phar.1147>
107. Griffin J (2001) The biology of signal transduction inhibition: basic science to novel therapies. *Semin Oncol* 28:3–8
108. Forner A, Llovet JM, Bruix J (2012) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379:1245–1255. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61347-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61347-0)
109. El-Serag HB (2011) Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365:1118–1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683>

110. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359:378–390. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
111. Sessa C, Guibal A, Del Conte G, Rüegg C (2008) Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol* 5:378–391. <https://doi.org/10.1038/nncponc1150>
112. Hunt SJ, Yu W, Weintraub J, et al (2009) Radiologic monitoring of hepatocellular carcinoma tumor viability after transhepatic arterial chemoembolization: estimating the accuracy of contrast-enhanced cross-sectional imaging with histopathologic correlation. *J Vasc Interv Radiol* 20:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2008.09.034>
113. Liu G, Rugo HS, Wilding G, et al (2005) Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a pharmacodynamic measure of response after acute dosing of AG-013736, an oral angiogenesis inhibitor, in patients with advanced solid tumors: results from a phase I study. *J Clin Oncol* 23:5464–5473. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.143>
114. Sahani DV, Kalva SP, Hamberg LM, et al (2005) Assessing tumor perfusion and treatment response in rectal cancer with multisection CT: initial observations. *Radiology* 234:785–792. <https://doi.org/10.1148/radiol.2343040286>
115. Kan Z, Phongkitkarun S, Kobayashi S, et al (2005) Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model. *Radiology* 237:151–158. <https://doi.org/10.1148/radiol.2363041293>
116. Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, et al (2005) The assessment of antiangiogenic and antivascular therapies in early-stage clinical trials using magnetic resonance imaging: issues and recommendations. *Br J Cancer* 92:1599–1610. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602550>
117. O'Connor JPB, Jackson A, Parker GJM, Jayson GC (2007) DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br J Cancer* 96:189–195. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603515>
118. Diederich S (2012) Imaging beyond RECIST: CT and MRI in molecular therapies. *Cancer Imaging* 12:347–350. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2012.9013>
119. Lencioni R, Llovet JM (2010) Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 30:52–60. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247132>
120. Song DS, Bae SH (2012) Changes of guidelines diagnosing hepatocellular carcinoma during the last ten-year period. *Clin Mol Hepatol* 18:258–267. <https://doi.org/10.3350/cmh.2012.18.3.258>
121. Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, et al (2012) Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol* 38:1195–1204. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.03.004>

122. Bonnin P, Villemain A, Vincent F, et al (2007) Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. *Ultrasound Med Biol* 33:561–570. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.09.010>
123. Dubois N, Bennoun M, Allemand I, et al (1991) Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J Hepatol* 13:227–239
124. Vincent F, Bonnin P, Clemessy M, et al (2009) Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* 69:2853–2860. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2484>
125. Boige V, Malka D, Bourredjem A, et al (2012) Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 17:1063–1072. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0465>
126. Sugarbaker PH (2006) New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome? *Lancet Oncol* 7:69–76. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70539-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70539-8)
127. Dohan A, Lousquy R, Eveno C, et al (2014) Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: An in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. *Am J Pathol* 184:1920–1929. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.03.004>
128. Wasnik AP, Maturen KE, Kaza RK, et al (2015) Primary and secondary disease of the peritoneum and mesentery: review of anatomy and imaging features. *Abdominal Imaging* 40:626–642. <https://doi.org/10.1007/s00261-014-0232-8>
129. Barral M, El Sanharawi I, Eveno C, et al (2019) Post-operative wall shear stress in the superior mesenteric artery: Biomarker of long term outcome in patients with residual disease after incomplete cytoreductive surgery for pseudomyxoma peritonei. *European Journal of Surgical Oncology* S0748798319303087. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.03.001>
130. Dohan A, Barral M, Eveno C, et al (2017) Prediction of clinical outcome using blood flow volume in the superior mesenteric artery in patients with pseudomyxoma peritonei treated by cytoreductive surgery. *Eur J Surg Oncol* 43:1932–1938. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.05.015>
131. Lo Dico R, Tijeras-Raballand A, Bonnin P, et al (2018) Hepatectomy increases metastatic graft and growth in an immunocompetent murine model of peritoneal metastases. *European Journal of Surgical Oncology* 44:784–791. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.01.096>
132. Bergé M, Allanic D, Bonnin P, et al (2011) Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling. *J Hepatol* 55:866–875. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.033>
133. Van de Sande L, Willaert W, Cosyns S, et al (2019) Establishment of a rat ovarian peritoneal metastasis model to study pressurized intraperitoneal aerosol

- chemotherapy (PIPAC). *BMC Cancer* 19:424. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5658-5>
134. Eveno C, Broqueres-You D, Feron J-G, et al (2011) Netrin-4 Delays Colorectal Cancer Carcinomatosis by Inhibiting Tumor Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 178:1861–1869. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.019>
 135. Otto J, Jansen PL, Lucas S, et al (2007) Reduction of peritoneal carcinomatosis by intraperitoneal administration of phospholipids in rats. *BMC Cancer* 7:104. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-104>
 136. Barral M, Raballand A, Dohan A, et al (2016) Preclinical Assessment of the Efficacy of Anti-Angiogenic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Ultrasound Med Biol* 42:438–446. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2015.10.012>
 137. Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* 29:15–18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>
 138. El sanharawi I, Barral M, Lenck S, et al (2018) Wall Shear Stress in the Feeding Native Conduit Arteries of Superficial Arteriovenous Malformations of the Lower Face is a Reliable Marker of Disease Progression. *Ultraschall in der Medizin - European Journal of Ultrasound* a-0729-2728. <https://doi.org/10.1055/a-0729-2728>
 139. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al (2018) Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 379:2495–2505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810858>
 140. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al (2017) Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:1274–1284. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30469-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30469-2)
 141. Pourageaud F, De Mey JG (1998) Vasomotor responses in chronically hyperperfused and hypoperfused rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 274:H1301-1307
 142. Katriotis D, Kaiktsis L, Chaniotis A, et al (2007) Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement. *Prog Cardiovasc Dis* 49:307–329. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.11.001>
 143. Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P (1992) Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 263:H1770-1778. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1770>
 144. Stuart J, Nash GB (1990) Technological advances in blood rheology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 28:61–93. <https://doi.org/10.3109/10408369009105898>
 145. Lee RT, Grodzinsky AJ, Frank EH, et al (1991) Structure-dependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques. *Circulation* 83:1764–1770. <https://doi.org/10.1161/01.cir.83.5.1764>

146. Merrill EW, Pelletier GA (1967) Viscosity of human blood: transition from Newtonian to non-Newtonian. *J Appl Physiol* 23:178–182.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1967.23.2.178>