

Université de Montréal

Thérapie provasculaire anti-cancer à l'aide de microbulles stimulées par ultrasons afin
d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie

Par

Simon Michon

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences appliquées
en Génie Biomédical (M.Sc.A.)

Août 2021

© Simon Michon, 2021

Université de Montréal

Unité académique : Département de Pharmacologie et Physiologie/Institut de Génie Biomédical,
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Thérapie provasculaire anti-cancer à l'aide de microbulles stimulées par ultrasons afin
d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie**

Présenté par

Simon Michon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alain Vinet, Ph.D.

Président-rapporteur

François Yu, Ph.D.

Directeur de recherche

Francis Rodier, Ph.D.

Codirecteur

Pierre Sonveaux, Ph.D.

Membre du jury

Résumé

L'hypoxie est un mécanisme reconnu de résistance à la radiothérapie chez les tumeurs solides. Il a récemment été démontré que la cavitation de microbulles (MBs) ciblées par ultrasons (US) (UTMC) peut augmenter la perfusion sanguine dans les muscles squelettiques en déclenchant la signalisation du monoxyde d'azote (NO). Il est intéressant de noter que cet effet a été amplifié par une co-injection de nitrite de sodium et a réduit le spasme observé avec des ultrasons à haute pression et à long pulse. Comme il a été démontré que le nitrite de sodium montrait une synergie avec la radiothérapie, nous avons émis l'hypothèse que les MBSU avec une co-injection de nitrite de sodium pourraient radiosensibiliser davantage les tumeurs solides en augmentant la perfusion sanguine et ainsi réduire l'hypoxie tumorale. Nous avons évalué la capacité des MBSU avec et sans nitrite d'augmenter la perfusion dans les muscles (membres postérieurs de la souris) et les tumeurs en utilisant différentes longueurs de pulse et pressions et évalué l'efficacité de cette approche en tant que thérapie provasculaire administrée directement avant les traitements de radiothérapie. Des xénogreffes de prostate humaine (PC3) ont été cultivées bilatéralement chez des souris immunodéficientes : un côté a été traité avec des MBSU et le côté controlatéral a été utilisé comme témoin. Des transducteurs thérapeutiques (pulse long) ou cardiaques (pulse court) ont été utilisés pour traiter le tissu d'intérêt lors de l'injection de MBs par la veine caudale. Le nitrite a été injecté 5 minutes avant les MBSU lorsque cela était approprié. Les MBSU consistaient en 60 impulsions thérapeutiques, administrées à un intervalle (10-15 secondes) ajusté pour permettre le réapprovisionnement en MBs, tel que guidé par l'imagerie ultrasonore à contraste amélioré (CEUS) (Sequoia, Siemens), et était généralement administré en 15 minutes. L'augmentation de la perfusion dans la tumeur a été quantifiée par *Burst Replenishment Imaging* permettant une quantification longitudinale de la perfusion sanguine ($A \times \beta$). Les souris ont été irradiées 10 minutes après les MBSU et la croissance tumorale a été suivie pendant 25 jours.

Dans le muscle, l'augmentation de la perfusion sanguine après traitement de MBSU avec différents longs pulses était forte.

Dans les tumeurs soumises à de longs pulses, l'augmentation de la perfusion était significative à une faible pression (125 et 250 kPa) mais pas à plus haute pression (375, 500 et 750 kPa) par rapport au groupe contrôle (0 kPa).

Lorsqu'associé à la radiothérapie, les MBSU avec des longs pulses à 250 kPa n'ont pas entraîné d'augmentation significative de l'efficacité du traitement. Les MBSU avec des pulses courts à haute pression (SONOS, 1500kPa) et co-injection de nitrite ont ensuite été validés dans le muscle. L'effet du traitement était fort. Cette augmentation de la perfusion était également visible dans les tumeurs soumises aux MBSU (SONOS) + nitrite et a duré au moins 10 minutes. Le nitrite seul n'a causé aucun changement de perfusion. De plus, les faibles réponses provasculaires observées pour les longs pulses à 750 kPa sans nitrite ont été renversées avec l'ajout de nitrite. Le SONOS a provoqué une augmentation de la perfusion, avec et sans nitrite. La validation histologique de la reperfusion dans les tumeurs traitées par SONOS + nitrite était également significative par rapport aux tumeurs recevant uniquement du nitrite.

Enfin, il y a eu une amélioration de l'inhibition de la croissance pour le groupe 8 Gy + nitrite + MBSU (SONOS) lorsque comparé à 8 Gy + nitrite seul. Cet effet n'était pas significatif chez les souris traitées par MBSU (SONOS) + nitrite et recevant 0 Gy ou 2 Gy.

En conclusion, la thérapie de MBSU + nitrite semble augmenter la perfusion sanguine conduisant à une efficacité accrue de la radiothérapie à 8 Gy dans notre modèle tumoral.

Mots-clés : Radiothérapie, Cancer, Microbulles, Ultrasons, Cavitation, Nitrite, Thérapie provasculaire, Hypoxie.

Abstract

In solid tumors, hypoxia is a recognized mechanism of resistance to radiation therapy. It has recently been shown that ultrasound (US) targeted microbubbles (MBs) cavitation (UTMC) can increase blood perfusion in skeletal muscles by triggering nitric oxide signaling. Interestingly, this effect was amplified with a sodium nitrite co-injection and reduced the spasm observed with high pressure long tone burst ultrasound. Since sodium nitrite has been shown to synergize with radiotherapy, we hypothesized that UTMC with a sodium nitrite co-injection could further radiosensitize solid tumors by increasing blood perfusion and thus reduce tumor hypoxia. We evaluated the ability of UTMC with and without nitrite to increase perfusion in muscle (mouse hindlimbs) and tumors using different pulse lengths and pressure and evaluated the efficacy of this approach as a provascular therapy given directly before radiotherapy treatments. Human prostate xenografts (PC3) were grown bilaterally in immunodeficient mice: one side was treated with UTMC, and the contralateral side was used as a control. Therapeutic transducers (long pulses) or cardiac phased array (short pulses) were used to treat the tissue of interest during the injection of MBs via the tail vein. Nitrite was injected 5 minutes before UTMC when appropriate. UTMC consisted of 60 therapeutic pulses, given at a pulse interval (10-15 seconds) adjusted to allow MB replenishment, as guided by contrast enhanced US imaging (CEUS), and was typically given in 15 minutes. The increase in perfusion in the tumor was quantified by burst replenishment imaging allowing longitudinal quantification of blood perfusion ($A \times B$). Mice were irradiated 10 minutes after UTMC, and tumor growth followed for 25 days.

In muscle, the increase in blood perfusion following UTMC treatment with various long pulses was strong.

In tumors subjected to long pulses, the increase in perfusion was significant at lower M.I. (125 and 250 kPa) but not at higher M.I. (375, 500 and 750 kPa) when compared to control (0 kPa).

When combined with radiotherapy, UTMC with long pulses at 250 kPa did not result in a significant increase in treatment efficacy. UTMC with short pulses (SONOS, 1500 kPa) and nitrite co-injection was then validated in muscle. The effect of treatment was strong and significant.

This significant increase in perfusion was also visible in tumors subjected to UTMC (SONOS) + nitrite and lasted for at least 10 minutes but not for nitrite alone. The blunted provascular responses observed for long pulses at higher M.I. without nitrite was reversed with the addition of nitrite. SONOS with and without nitrite caused an increase in perfusion. Histological validation of reperfusion in SONOS + nitrite was also significant when compared to tumors receiving only nitrite alone.

Finally, there was an improved growth inhibition for the 8 Gy + nitrite + UTMC group vs. 8 Gy + nitrite alone with the SONOS therapy. This effect was not significant with mice treated by UTMC + nitrite and receiving 0 Gy or 2 Gy. In conclusion, UTMC + nitrite seemed to increase blood flow leading to an increased radiotherapy efficacy at 8 Gy in our tumor model.

Keywords: Radiotherapy, Cancer, Microbubbles, Ultrasound, Cavitation, Nitrite, Provascular therapy, Hypoxia.

Table des matières

RÉSUMÉ	5
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	15
PRÉFACE	19
MOTIVATION	20
STRUCTURE	20
SECTION I : REVUE DE LITTÉRATURE	21
CHAPITRE 1 – ULTRASONS	23
PRINCIPE PHYSIQUE	23
UTILISATION DIAGNOSTIQUE	25
UTILISATION THÉRAPEUTIQUE	27
CHAPITRE 2 – MICROBULLES	29
CARACTÉRISATION	29
INTERACTIONS BULLES, ULTRASONS ET CELLULES	32
<i>Concepts clés</i>	32
<i>Utilisation diagnostique</i>	36
<i>Utilisations thérapeutiques</i>	37
Livraison ciblée	38
Sonothrombolyse	39
Ouverture de la barrière hémato-encéphalique	39
<i>Interactions thérapeutiques dans le traitement du cancer</i>	40
Thérapie sonodynamique	40
Augmentation de la perméabilité vasculaire	40
Immunothérapie	41
Thérapie anti-vasculaire	41
<i>MBSU et monoxyde d'azote</i>	42
<i>Donneurs de NO</i>	45

<i>MBSU et nitrite</i>	46
CHAPITRE 3 – CANCER ET TRAITEMENTS	49
PRÉVALENCE ET IMPORTANCE	49
TRAITEMENTS	51
<i>Thérapies biologiques</i>	52
Blocage des points de contrôle immunitaires « <i>immune checkpoint blockade</i> »	52
Thérapies cellulaires adaptatives	52
Vaccins anti-tumeurs	53
Virus oncolytiques	53
Inhibiteurs de kinases	54
Hormonothérapie	54
Traitements anti-angiogéniques	54
<i>Chimiothérapie</i>	55
RADIOTHÉRAPIE	56
<i>Principe</i>	56
<i>Agents d'amélioration d'efficacité de la radiothérapie</i>	59
Biomarqueurs de sensibilité à la radiation	60
Inflammation	60
Génomique	61
Immunité tumorale	61
Métabolisme oxydatif	62
VASCULARISATION TUMORALE ET HYPOXIE	62
<i>Agents anti-hypoxique</i>	63
HAPs (Hypoxia-Activated Products)	63
Oxygène hyperbarique (HBO)	64
Agents modificateurs allostériques de l'hémoglobine	64
Molécules augmentant la diffusion de l'oxygène	64
Thérapies génétiques	64
Agents induisant une vasodilatation tumeur-sélective	65
Agents de transport d'oxygène	65
SECTION II : ARTICLE ET COMPLÉMENTS	66
CHAPITRE 4 – OBJECTIFS	67
PROJET DE THÉRAPIE PROVASCULAIRE : HYPOTHÈSES	67
ÉCUEILS D'AUTRES TECHNIQUES SIMILAIRES	67
<i>Agents anti-hypoxiques</i>	67
<i>Agents améliorant l'efficacité de la radiothérapie</i>	68

<i>Combinaisons thérapeutiques antitumorales microbulles et ultrasons</i>	69
AVANTAGES DE LA THÉRAPIE PROVASCULAIRE CIBLÉE	69
CHAPITRE 5 – ARTICLE CENTRAL	71
PRÉSENTATION	71
ARTICLE EN PROCESSUS DE SOUMISSION À BIONCONJUGATE CHEMISTRY	73
<i>Abstract</i>	73
1. <i>Introduction</i>	74
2. <i>Material and methods</i>	76
2.1 Cell Culture conditions	76
2.2 Animal Model.....	77
2.3 Ultrasound Contrast Agents.....	77
2.4 Ultrasound Perfusion Imaging and Therapy.....	77
2.5 Experimental Protocol for Burst Replenishment Imaging.....	78
2.6 Histology	79
2.7 Radiotherapy.....	81
2.8 Burst Replenishment Imaging - Cine-loops Analysis	81
2.9 Statistics	83
3. <i>Results</i>	83
3.1 UTMC increases perfusion in muscle	83
3.2 Provascular response to UTMC as a function of pressure in tumor with the 1 MHz transducer	85
3.3 Provascular response to UTMC in tumors with a clinical scanner, with and without nitrite	87
3.4 Histology	88
3.5 Radiotherapy.....	90
4. <i>Discussion</i>	92
4.1 Comparison of single element and SONOS in muscle	92
4.2 UTMC provascular response in tumors with long pulses	92
4.3 UTMC provascular response in tumors with SONOS and nitrite.....	93
4.4 Synergy with radiotherapy.....	94
4.5 Provascular responses and histological reperfused areas	95
4.6 Limitations	95
5. <i>Conclusions and clinical impact</i>	96
Associated Content	97
Corresponding Author * :	97
Author Contributions	97
Funding Sources	97
Acknowledgements	98
Abbreviations	98

<i>Supplementary Figures</i>	99
CHAPITRE 6 : ÉLÉMENTS COMPLÉMENTAIRES	103
MÉTHODES	103
<i>Modèle animal</i>	103
<i>Ultrasound Contrast Agents</i>	103
<i>Burst Replenishment Imaging - Cine-loops Analysis</i>	103
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	104
<i>Évaluation des facteurs influençant la perfusion</i>	104
<i>Relation entre la valeur de perfusion pré-traitement et le changement relatif de perfusion post-traitement</i>	105
DISCUSSION SUPPLÉMENTAIRE	106
<i>Influence des paramètres impactant la perfusion</i>	106
<i>Caractère prédictif de la perfusion initiale</i>	107
CONCLUSION	108
CONTRIBUTIONS.....	110
PERSPECTIVE	110
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113

Liste des figures

Figure 1.1 : Paramètres principaux d'une onde ultrasonore	23
Figure 1.2 : Différence entre le mode B et l'imagerie par agents de contraste des mêmes vaisseaux.....	26
Figure 1.3 : Ultrasons concentrés à haute intensité (HIFU)	28
Figure 2.1 : Composition d'une microbulle.....	31
Figure 2.2 : Principe de fabrication de microbulles.....	32
Figure 2.3 : Interaction d'une onde ultrasonore à l'interface entre deux milieux	33
Figure 2.4 : Cavitation des microbulles en présence d'un champ ultrasonore	35
Figure 2.5 : Évolution des publications sur Pubmed sur les microbulles et ultrasons.....	38
Figure 2.6 : Cascade de sécrétion du NO suite aux forces de cisaillement	43
Figure 2.7 : Phosphorylation in vitro des eNOS.....	44
Figure 2.8 : Mesure du niveau de NO à la suite d'un traitement de MBSU, avec ou sans LNAME.....	44
Figure 2.9 : Images de CEUS prises 20 secondes après un « burst » ayant fait éclater toutes les bulles circulantes	45
Figure 2.10 : Influence d'une co-injection de nitrite pour la thérapie de MBSU	47
Figure 3.1 : Prévalence du cancer dans le monde en 2020 chez la femme et l'homme	49
Figure 3.2 : Caractéristiques du cancer et cibles thérapeutiques associées	51
Figure 3.3 : Mécanismes biologiques d'action de la radiothérapie.....	58
Figure 4.1 : Experimental setup and protocol for in vivo perfusion quantification using US contrast imaging and UTMC treatment.....	79
Figure 4.3 : UTMC mediated provascular response in the hindlimb muscle.....	84
Figure 4.4 : Provascular response in PC3 tumors	86
Figure 4.5 : Effect of UTMC + nitrite on tumor perfusion kinetics.....	90
Figure 4.6 : Histological analysis of tumor hypoxia after UTMC (SONOS) therapy.....	91
Figure 4.7 : Effect of UTMC on Radiotherapy Efficacy	91
Figure S1: Pre/Post UTMC perfusion values in the hindlimb muscle for various conditions.....	99

Figure S2: Pre/Post UTMC perfusion values in the tumor following single element transducer treatment	99
Figure S3: Tumor sizes before radiotherapy	100
Figure S4: Temporal windows following single element transducer treatment	100
Figure S5: Regions affected by different therapeutic pulses during treatment	101
Figure Complémentaire 6.1 : Évaluation des paramètres influençant la perfusion	105
Figure Complémentaire 6.2 : Rapport entre la valeur absolue de perfusion pré-traitement et le changement relatif de perfusion post-traitement	106

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BBB : Blood Brain Barrier

BRCA1 : breast cancer 1

CAR-T : Chimeric Antigen Receptor T-cell

CEUS : Contrast Enhanced Ultrasound

cGMP : Cyclic guanosine monophosphate

CMH-1 : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DPPA : azoture de diphénylphosphoryle

DPPC : 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine

DSPPE-MPEG5000 : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-5000]

eNOS : endothelial Nitrous Oxyde Synthase

FDA : Food & Drug Administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

GTP : Guanosine Triphosphate

Gy : Gray

HAP : Hypoxia-Activated Prodrugs

HBO : Oxygène hyperbarique

HIF-1a : Hypoxia Induced Factor – 1a

HIFU : High Intensity Focused Ultrasound

Hsp90 : Heat Shock Protein 90

HSV : Herpes simplex virus

Hz, kHz, MHz : Hertz, kilo Hertz, Méga Hertz

I.M./M.I. : Index mécanique/méchanical index

LNAME : N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

MB : microbulles

NO : Monoxyde d'azote

OCT : Optimal Cooling Temperature

Oxy-Hb : Oxygenated-Haemoglobin

Pa, kPa, MPa : Pascal, kilopascal, mégapascal

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PD-1 : Programmed Death 1

PD-L1 : Programmed Death Ligand 1

PFC, FC : Perfluorocarbures, Fluorocarbones

ROI : Region of Interest

ROS : Reactive Oxygen Species

RT : Radiotherapy

SNC : Système Nerveux Central

SNO-Hb : S-nitrosohaemoglobin

TIL : Tumor Infiltrating Leucocyte

TSC : Trans Sodium Crocetinate

US : Ultrasons

UTMC/MBSU : Ultrasound Triggered Microbbuble Cavitation/Microbulles Stimulées par Ultrasons

UTMD : Ultrasound Triggered Microbubbles Destruction

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VPH : Virus du Papillome Humain

Préface

J'aimerais tout d'abord remercier **François Yu** pour tout le temps investi, les conseils donnés, l'éthique de recherche inculquée, l'accessibilité et la dédication, mais surtout la patience et les encouragements lors des temps plus difficiles. Il aurait été facile de mettre un stop à ce projet à l'arrivée du COVID-19, de se satisfaire des résultats obtenus et de remettre un mémoire dans les temps normaux de complétion de maîtrise. Nous avons cependant pris la décision d'aller jusqu'au bout, quitte à prolonger de près d'un an ces travaux, mais pour finalement arriver à un aboutissement dont nous pouvons être fiers.

Je ne pourrais remercier non plus assez **tous les gens du MTL Yu-Lab et du LBUM** pour leur support, leurs questions, leur disponibilité, leur aide. Malgré la distance qui nous a trop longtemps éloignés, de les savoir évoluer parallèlement à moi au fil des jours était un encouragement indicible non-négligeable.

Des remerciements s'imposent également au personnel des différentes plateformes du CRCHUM dont **l'animalerie, la pathologie cellulaire et l'imagerie cellulaire**, ainsi que tous les gens ayant aidé, de près ou de loin, à ce projet. Travaillant bien souvent dans l'ombre, à essayer de faire du sens de mes questions nébuleuses tout en restant patientes, accessibles et humaines (accordons ici à la majorité), j'y ai rencontré des personnes inspirantes et passionnées.

Je voudrais également remercier **l'institut TransmedTech, le Réseau de Bio-Imagerie du Québec, l'institut du Cancer de Montréal et le département de Radiologie, Radio-oncologie et Médecine Nucléaire de l'Université de Montréal** pour leur soutien financier, si nécessaire pour un étudiant gradué.

J'aimerais finalement remercier **famille et amis** d'avoir toujours supporté, sans bien souvent comprendre, les presque trois dernières années de mon parcours. Merci d'être présents, peu importe.

Motivation

Le projet de thérapie provasculaire tient son origine des travaux effectués par l'équipe du Dr. François Yu lors de son post-doctorat à Pittsburgh et publiés en 2017¹. Il s'agit d'une extension des connaissances acquises sur les effets stimulateurs des microbulles et ultrasons sur la stimulation de la voie de l'oxide nitrique et de la vasodilatation subséquente dans le muscle, mais appliqué cette fois aux tumeurs et au potentiel thérapeutique d'une telle technique.

Structure

Le présent document est un mémoire de maîtrise présenté sous format hybride, avec comme élément central un article en processus de soumission. Deux sections se retrouvent dans les prochaines pages, chacune divisée en trois chapitres.

Une revue de littérature exhaustive entame ce travail, avec un accent mis sur les ultrasons, les microbulles et leurs interactions, et finalement le cancer. Cette revue de littérature se veut un complément des éléments de l'introduction de l'article, sans pour autant en être une répétition. Suit ensuite une seconde section, soit celle présentant tout d'abord les objectifs du projet et l'article, l'article central de ce mémoire et finalement quelques éléments complémentaires au projet qui ne se retrouvent pas dans l'article.

Section I : Revue de littérature

Chapitre 1 – Ultrasons

Principe physique

Le son est la production, la propagation et la perception d'une vibration sous la forme d'ondes acoustiques à travers différents médiums. Celui-ci est généré par une source émettrice, créant une vibration initiale qui se déplace dans le médium environnant par des zones de compression et raréfaction des molécules du milieu de propagation, sans néanmoins générer un déplacement net des particules du milieu : la vibration des particules est responsable du transport des vibrations.

Plusieurs paramètres permettent de caractériser une onde sonore, paramètres communs aux propriétés des ondes en général :

- La fréquence (f) : le nombre de cycles par secondes, mesurée en Hertz (Hz);
- La longueur d'onde (λ) : l'inverse de la fréquence x la vitesse du son; il s'agit de la distance entre deux points correspondants de l'onde, soit un cycle complet, mesurée en mètres (m);
- La période (T) : le temps requis pour compléter un cycle complet, mesuré en secondes (s);
- L'amplitude (A) : la hauteur de l'onde, correspondant à la moitié de la différence entre les pressions acoustiques maximale et minimale. Pour une onde sonore, celle-ci s'exprimera en Pascal (Pa).

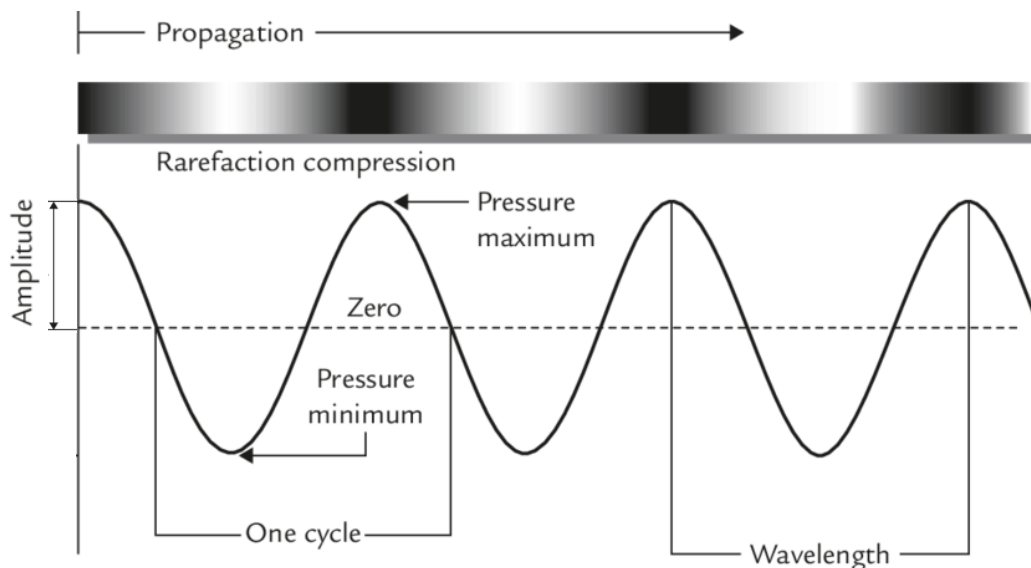


Figure 1.1 : Paramètres principaux d'une onde ultrasonore. Adapté de Su et al. (2008)²

En termes acoustiques, la fréquence déterminera la tonalité du son. Un son plus aigu aura une fréquence plus élevée, tandis qu'un son plus grave aura une fréquence plus grave. C'est avec l'échelle de fréquences sonores que l'on pourra classer les infrasons (inférieur à 20 Hz), les sons (audibles pour l'oreille humaine, entre 20 et 20 000 Hz) et les ultrasons (supérieurs à 20 000 Hz). Il s'agit donc de définitions anthropocentriques, comme différents animaux ont différents seuils d'audition.

L'amplitude permettra de quantifier l'intensité sonore. Celle-ci est communément quantifiée en décibels (dB), calculé en fonction de la formule suivante :

$$L_p = \log_{10} \left(\frac{p_1}{p_0} \right) \quad 1.1$$

Où :

L_p = Niveau de pression du son (Décibels);

p_1 = Pression son (Pascals);

p_0 = Pression de référence du son (minimum audible par l'humain, Pascals).

La vitesse du son (c) dans un milieu donné est quant à elle dépendante des caractéristiques du milieu de propagation. De manière générale, la vitesse du son est proportionnelle à la racine carrée du ratio du module d'élasticité isostatique (K : mesure de la résistance à la compression) du milieu sur sa densité (ρ).

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad 1.2$$

La vitesse du son dans un milieu de propagation plus dense sera donc moins rapide que dans un milieu moins dense.

Finalement, il est important d'ajouter que comme toute onde, des phénomènes de diffraction, de réflexion, de réfraction et d'interférence pourront avoir lieu avec les ondes sonores. Ces phénomènes influenceront plus ou moins le comportement de l'onde et sa propagation³.

Utilisation diagnostique

Les premières utilisations médicales de machines d'imagerie échographique ont été reporté vers la fin des années 1940 par le Dr. George D. Ludwig au Naval Medical Research Institute dans le Maryland, et subséquemment au Massachusetts Institute of Technology. Celui-ci a démontré pour la première fois que les calculs de vésicule biliaire pouvaient être imagés par imagerie ultrasonore⁴. Depuis, de nombreuses avancées ont permis de démocratiser l'imagerie ultrasonore et d'en faire la technique d'imagerie la plus utilisée en clinique de manière routinière en Amérique du Nord⁵. De par son faible coût, son caractère non-invasif, sa facilité d'utilisation et l'opportunité d'avoir des images en temps réel, les échographies constituent maintenant l'examen de choix pour une panoplie de tests diagnostiques⁶.

Les ondes ultrasonores sont formées par un transducteur piézoélectrique, généralement composé de céramique, ayant la propriété de générer une déformation mécanique en réponse à un champ électrique et vice versa (produire un champ électrique suite à une stimulation mécanique). Si le courant est alternatif, la réponse mécanique résultante sera une vibration entraînant des fluctuations de pression pouvant générer les régions de compression et de raréfaction abordées précédemment. Selon la vitesse de vibration du transducteur, une onde ultrasonore de fréquence donnée sera produite.

Les transducteurs modernes permettent d'envoyer un faisceau composé de plusieurs ondes ultrasonores pouvant être focalisées à un point d'intérêt. Ces ondes se propagent dans les milieux à imager et se dispersent ou se reflètent selon les caractéristiques des structures rencontrées. Notamment, les différences d'impédances acoustiques (résistance au passage de l'onde) entre les milieux produisent de fortes réflexions dont une partie retournera au transducteur. Ce même transducteur transforme l'information mécanique transmise par l'onde en un signal électrique, lequel sera par la suite converti en image.

L'imagerie ultrasonore fonctionne donc comme l'écholocalisation; une onde ultrasonore est produite pour ensuite se réfléchir sur des surfaces d'intérêt et revenir à la source à une vitesse et intensité plus ou moins grande, permettant d'en conclure sur la position des objets se situant dans le milieu où s'est propagé l'onde.

Il est à noter que la fréquence de l'onde sonore est cruciale dans la détermination des structures à imager. En effet, plus la fréquence est grande, plus les ultrasons seront absorbés et réfléchis, mais plus l'image résultante sera détaillée. Un compromis entre le niveau de détail requis et la pénétration voulue est donc toujours à garder en tête. Une fréquence plus faible produira donc moins de détails, mais pourra pénétrer plus profondément dans le milieu sans être trop réfléchi⁷. Les ultrasons utilisés en clinique de manière diagnostique se retrouvent habituellement entre 2 et 20 MHz. Par exemple, des fréquences de 2-5 MHz sont utilisées pour l'imagerie obstétrique et l'abdomen profond, tandis que des fréquences de 10-15 MHz seraient plutôt pour imager les structures superficielles, dont les veines de surface et les tissus musculosquelettiques.

Différents modes d'imageries ultrasonores sont maintenant utilisés au quotidien en clinique pour permettre de distinguer différentes structures avec une précision plus grande. D'intérêt, citons :

- Le mode B (Brightness) : chaque pixel représenté sur l'image représente l'amplitude d'intensité du signal ultrasonore réfléchi, permettant d'identifier les structures anatomiques.
- Le mode Doppler : utilise l'effet Doppler se basant sur la modification de la fréquence d'un objet observé selon un observateur suite à un mouvement relatif entre la source et l'observateur. Ce mode permet d'imager des objets en mouvement selon leur vitesse relative au transducteur. Ce mode est très utilisé pour imager le débit sanguin à travers le système cardiovasculaire.
- Le CEUS (Contrast enhanced ultrasound) : n'est pas un mode d'imagerie ultrasonore en soi, mais plutôt l'ajout d'agents de contraste permettant d'intensifier la rétrodiffusion (*backscatter*) des ondes ultrasonores et d'ainsi intensifier les contrastes entre les structures. On utilise souvent le mode B en combinaison avec le mode CPS (Cadence Pulse Sequencing) pour imager les agents de contraste. Cette méthode sera détaillée plus loin.

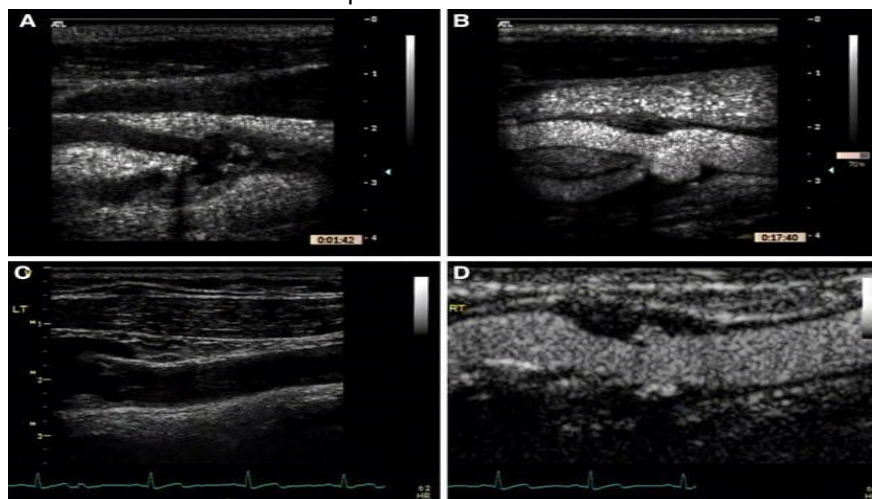


Figure 1.2 : Différence entre le mode B (A et C) et l'imagerie par agents de contraste (CEUS : B et D) des mêmes vaisseaux. Adapté de Feinstein et al. (2009)⁸

Utilisation thérapeutique

En plus de leur utilisation diagnostique bien connue, les ultrasons sont également employés de manière thérapeutique pour de nombreuses applications⁹. Beaucoup des thérapies à base d'ultrasons utilisent la chaleur résultant de l'absorption d'énergie ultrasonore par les tissus biologiques comme voie de traitement. Si la chaleur résultant des ultrasons diagnostiques est considérée comme plutôt négligeable, des ultrasons de plus forte intensité peuvent entraîner une augmentation considérable de température de manière focalisée ou non. Selon le gradient de température généré, les ultrasons peuvent engendrer un réchauffement moyen, une nécrose coagulante ou même la vaporisation des tissus.

Le réchauffement des tissus non focalisé comme thérapie est utilisé pour traiter des douleurs tendineuses et musculaires. Cette méthode n'est cependant pas prouvée comme ayant des résultats probants¹⁰. La grande majorité des thérapies ultrasonores utilisant la production de chaleur comme élément central se concentre sur les ondes focalisées, soit le HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*). Ce traitement permet de concentrer avec une précision millimétrique le point de mire des ultrasons thérapeutiques afin d'y appliquer une dose d'énergie suffisante pour entraîner la nécrose de la région d'intérêt¹¹. À titre comparatif, l'énergie typiquement déposée par des ultrasons diagnostiques peut aller jusqu'à 720 mW/cm²; l'intensité du HIFU dans la région focalisée tourne quant à elle autour de 100-10000 W/cm². L'effet thermique responsable est dû à l'absorption d'énergie acoustique causant une élévation rapide de la température localement. Une température supérieure à 60°C pour une seconde est suffisante pour générer une mort cellulaire instantanée et irréversible par nécrose coagulante¹². La thermoablation des tissus sains étant cependant à éviter, il est nécessaire de combiner cette technique avec une méthode d'imagerie (typiquement les ultrasons ou la résonance magnétique)¹³ afin d'assurer la précision du traitement. Le HIFU comporte de grands avantages dans le traitement tumoral en comparaison avec les traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie) : non-invasif, non-ionisant et extracorporel, cette technique est maintenant utilisée pour plusieurs applications cliniques¹⁴. Il faut cependant noter que le temps de traitement est généralement assez long, que le mouvement du patient est un grand facteur limitant, et que les tissus dans le

champ proche d'exposition aux ultrasons est propice à des brûlures. Des douleurs ont également été reportées⁹.

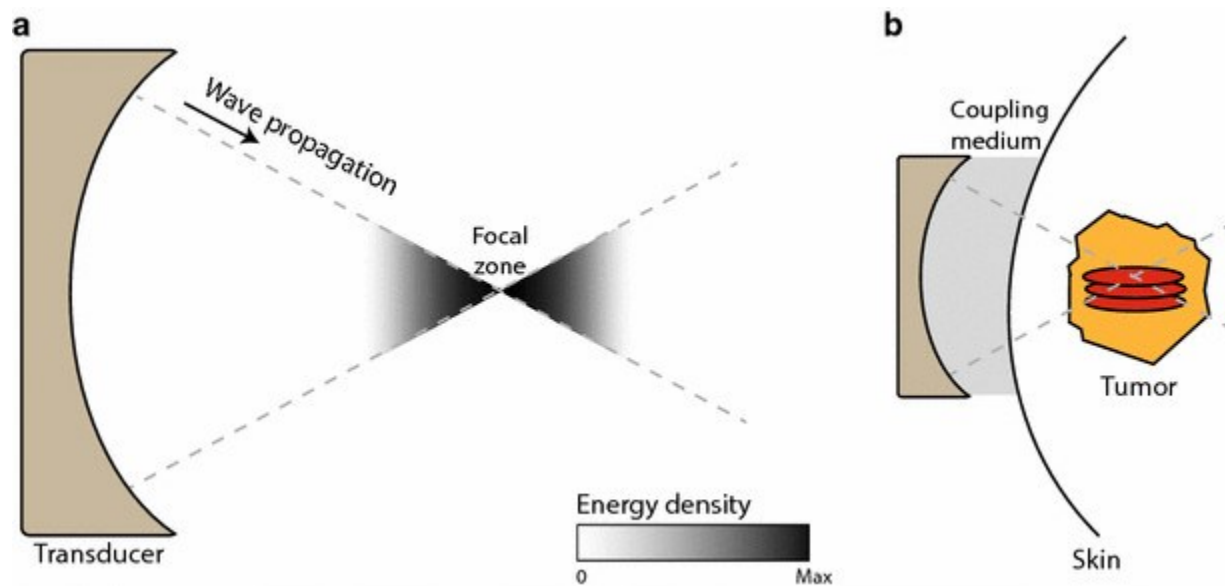


Figure 1.3 : Ultrasons concentrés à haute intensité (HIFU). a) le faisceau ultrasonore peut être concentré dans une zone focale pour générer des lésions thermiques sur une tumeur (b). Adapté de Van den Bijgaart et al. (2017)¹⁵

Chapitre 2 – Microbulles

Caractérisation

Les microbulles sont des petites bulles de gaz encapsulées entre 1 et 10 μm utilisées principalement comme agents de contraste en imagerie ultrasonore.

Le potentiel de celles-ci en imagerie diagnostique a été découvert par accident en 1968, suite à l'injection non voulue de bulles d'air dans une solution saline injectée directement dans le cœur avant d'imager par ultrasons. Cette injection a permis d'augmenter de manière significative la délimitation aortique à l'imagerie; cependant, les bulles n'étant pas encapsulées, celles-ci ne duraient que quelques secondes in vivo avant de disparaître¹⁶. Depuis, de nombreuses améliorations ont permis de saisir le potentiel des microbulles comme agents de contraste et d'en faire un outil utilisé de manière routinière à ce jour en clinique.

La première génération de microbulles consistait en simples bulles de gaz non encapsulées. Celles-ci étant trop grosses (filtrées par les poumons) et trop solubles dans le sang comme elles n'étaient pas encapsulées pour rester stables plus que quelques secondes^{17,18}, le développement d'agents de contrastes plus persistants devenait impératif. Ont ensuite suivi des microbulles stabilisées par une mince couche d'albumine (Albunex™) ou d'acide palmitique de galactose (Levovist™). Plus durables que les bulles de première génération, celles-ci arrivaient à passer le lit capillaire pulmonaire, mais ne duraient pas lorsque confrontées aux gradients de pression artérielle¹⁹. Une troisième génération de bulles a ensuite vu le jour, celles maintenant utilisées cliniquement. Ces microbulles se voient remplies de gaz avec un haut poids moléculaire, ce qui va entraîner une baisse de la solubilité sanguine. De plus, une couche composée de surfactants, de lipides, de protéines, de polymères ou d'une combinaison de ceux-ci permettra de stabiliser les microbulles de manière à ce qu'elles puissent rester en circulation pendant plusieurs minutes²⁰.

Typiquement, les gaz utilisés sont des perfluorocarbures (PFC de composition C_xF_y) comme les Definity™ utilisées en Amérique du Nord, ou de l'hexafluorure de soufre (SF_6), entrant dans la

conception des SonoVue™ approuvées en Europe. Ces gaz très peu solubles permettent d'augmenter le temps de circulation dans le sang de manière significative; on reporte même une demi-vie de près de 10 minutes chez la souris²¹.

L'enveloppe protectrice peut quant à elle être composée d'une variété de différents composés biocompatibles stabilisant les bulles²⁰. Les premières enveloppes étaient principalement protéiques, comme les microbulles Albunex™ composées d'air entouré d'une monocouche d'albumine dénaturée²². Les ponts disulfures entre les résidus cystéines permettant de maintenir la couche d'albumine en place sont également présents sur la plupart des protéines, ce qui fait que d'autres formulations protéiques ont également été expérimentées^{23,24}. Certaines capsules composées de surfactants synthétiques (SPAN-40, TWEEN-40, stéarate de sucrose) ont également été testées, mais avec peu de débouchées cliniques²⁵⁻²⁷. Une classe particulière d'agents de contraste protégés par d'épaisses coquilles de polymères existe également, formant une couche plus résistante mais aussi moins compressible. Comme défini plus en détail plus bas, cette capacité de compression/extension est justement ce qui augmente l'échogénicité; les microbulles encapsulées par polymères augmentent donc moins le contraste ultrasonore²⁸.

Les enveloppes les plus communes aujourd'hui sont plutôt lipidiques (SonoVue™, Definity™), inspirées du surfactant naturel des poumons²⁹. Ces types d'enveloppes comportent plusieurs avantages intéressants : (1) les phospholipides tendent à s'assembler d'eux-mêmes en monocouche orientée à l'interface gaz/eau, orientant naturellement les têtes hydrophiles vers l'eau et les chaînes hydrophobes vers le gaz; (2) une faible tension de surface stabilise la microbulle, en raison de la compressibilité latérale dont fait preuve la monocouche de phospholipides, et diminue la pression de Laplace qui causerait une diffusion rapide du gaz hors des microbulles^{30,31}; (3) les monocouches de lipides ont une grande cohésion en raison des forces de van der Waals et des liens hydrophobes, ce qui leur donne un aspect pratiquement solide³²; (4) les lipides sont retenus ensemble par des interactions faibles, ce qui rend l'enveloppe COMPLIANTE aux phases de compression et d'expansion, caractéristique idéale pour un agent de contraste ultrasonore^{33,34}; (5) les microbulles avec des capsules lipidiques peuvent facilement être utilisées comme vecteur pour de nombreux médicaments, imagerie moléculaire ou autre fonction en bio-conjuguant les têtes lipidiques de l'enveloppe avec d'autres molécules d'intérêt³⁵.

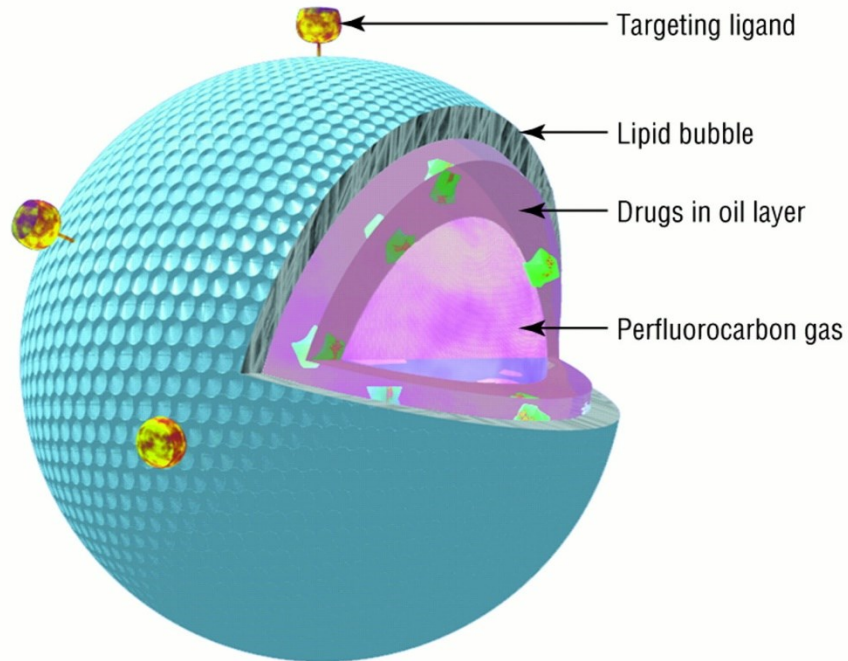


Figure 2.1 : Composition d'une microbulle. Adapté de Blomley et al. (2001)³⁶

De nombreux processus de fabrications peuvent être utilisés pour la synthèse de microbulles, variables selon le rendement désiré, la composition de la coquille et du gaz, les éléments à ajouter à la bulle, etc. Citons deux techniques couramment utilisées, soit la fabrication par agitation mécanique ou par sonication.

La création de bulles par agitation mécanique est un processus en deux étapes. Les phospholipides sont tout d'abord créés à partir d'une des méthodes conventionnelles, soit l'hydratation d'un mince film de phospholipides, l'injection d'éthanol ou l'inversion de phase dans laquelle on aurait ajouté les drogues que l'on désirerait intégrer aux microbulles. Cette solution est ensuite placée dans des fioles, et l'espace restant dans celles-ci est occupé par le gaz à encapsuler dans les microbulles. On procède ensuite à une agitation importante, ce qui créera les bulles voulues. La sonication, autre technique très courante, utilise au lieu de l'agitation mécanique une sonde envoyant des ultrasons à faible fréquence et haute intensité pour entraîner une cavitation dans le milieu aqueux qui va former les microbulles. D'autres méthodes que l'agitation mécanique ou la sonication permettent de créer des bulles, telles que l'évaporation de solvant après émulsion ou bien la polymérisation cross-linkage³⁷.

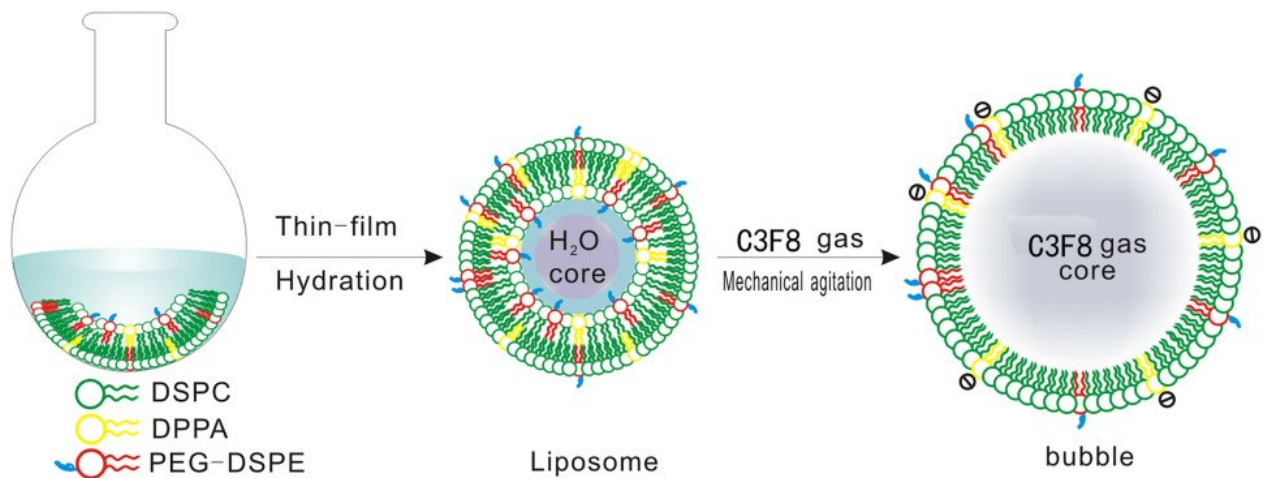


Figure 2.2 : Principe de fabrication de microbulles. Adapté de Li et al. (2018)³⁸

Il est ensuite important de mesurer certains paramètres afin de s'assurer de la qualité du produit fini. Par exemple, les microbulles Definity™ utilisées pour le projet de thérapie provasculaire et composées d'octafluoropropane (C_3F_8) et de trois phospholipides (DPPA, DPPC, DPPE-MPEG5000) arrivent à terme dans une fiole contenant un liquide laiteux. Celui-ci est composé d'environ $84,0 \pm 11,1 \times 10^8$ microbulles/mL, de diamètre compris entre 1,1 et 3,3 μm ^{39,40}.

Interactions bulles, ultrasons et cellules

L'utilisation de microbulles comme agents de contraste est devenue routinière en clinique. De plus, dans les dernières décennies, des thérapies se basant sur les interactions entre les microbulles, les ultrasons et les tissus environnants sont de plus en plus fréquentes. Quelques concepts centraux seront ici définis, essentiels pour la compréhension de cette dynamique.

Concepts clés

Les ultrasons générés par un transducteur sont une onde mécanique transmettant des variations rapides de pression. Les microbulles qui se trouvent dans le champ acoustique (région atteinte par l'onde ultrasonore) se voient donc impactée par ces variations de pression et entrent dans un état d'oscillation (compression et expansion).

1. Impédance acoustique (Z)

L'impédance acoustique est une propriété d'un matériel (d'un tissu) qui détermine la facilité avec laquelle un ultrason peut traverser ce milieu. Cette dernière est proportionnelle à la densité du matériel et à sa vélocité acoustique (vitesse à laquelle l'ultrason passe à travers un milieu). L'impédance acoustique est l'une des propriétés centrales à la formation d'image ultrasonore. En effet, plus la différence d'impédance acoustique entre deux milieux est grande, plus l'ultrason incident sera réfléchi à l'interface entre ces deux milieux. À l'inverse, peu d'ultrasons seront réfléchis à l'interface entre deux milieux ayant pratiquement la même impédance acoustique. La quantité d'ultrason réfléchi sera donc correspondante à cette formule⁴¹ :

$$U_r = \frac{(Z_2 - Z_1)^2}{(Z_2 + Z_1)^2} \quad 2.1$$

Où :

U_r = Ultrason réfléchi;

Z_1 = Impédance acoustique du matériel 1;

Z_2 = Impédance acoustique du matériel 2.

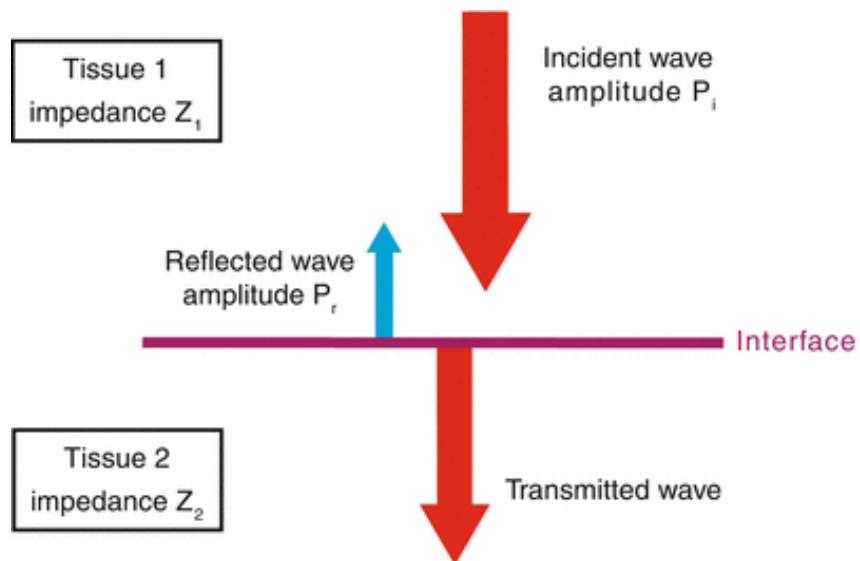


Figure 2.3 : Interaction d'une onde ultrasonore à l'interface entre deux milieux. Adapté de <https://thoracickey.com/science-of-ultrasound-and-echocardiography/> (consulté en juillet 2021)⁴²

L'augmentation du contraste produite par les microbulles est conséquence de deux phénomènes⁴³. Tout d'abord, les ondes ultrasonores se voient dispersées par les microbulles en raison de la grande différence d'impédance acoustique entre le gaz au centre des bulles et le liquide environnant. Ensuite, et de manière plus importante, la compressibilité des microbulles fait que celles-ci vont osciller de manière volumétrique. Lorsque soumises à de faibles pressions ultrasonores, les microbulles vont faire des oscillations linéaires, et la fréquence de l'ultrason incident est égale à la fréquence d'oscillation de la microbulle. Lorsque la pression ultrasonore dépasse quelques centaines de kilopascals, les oscillations cessent d'avoir un comportement sinusoïdal et renvoient des ondes ultrasonores harmoniques non-linéaires, multiples de la fréquence fondamentale transmise⁴⁴. Comme ces ondes harmoniques réfléchies ne sont pas typiquement émises par les tissus environnants, celles-ci peuvent être vues comme une signature des microbulles. L'intensité de ces ondes est maximale lorsque les bulles oscillent à leur fréquence de résonance, que l'on peut déterminer à l'aide de cette formule⁴⁵ :

$$f_r = \frac{1}{2\pi r} \sqrt{\frac{3\kappa p_e + 12G_s \frac{d_s}{r}}{\rho}} \quad 2.2$$

Où :

f_r = Fréquence de résonance;

κ = l'index polytropique du gaz;

p_e = l'équilibre de pression de gaz dans la microbulle;

G_s = le module de cisaillement de la coquille;

d_s = l'épaisseur instantanée de la coquille;

ρ = la densité du milieu environnant.

La fréquence de résonance de la microbulle dépend donc de plusieurs caractéristiques qui lui sont intrinsèques, mais il est généralement convenu qu'il s'agit d'un effet taille-dépendant. Ce processus d'oscillation contrôlé s'appelle la cavitation stable. À noter, les fréquences de résonance des microbulles approuvées pour être utilisées comme agents de contraste en cliniques se situent autour des fréquences émises par les ultrasons diagnostiques, soit autour de 1-10 MHz.

Une augmentation de la pression ultrasonore au-delà de ces valeurs résultera en un processus appelé cavitation inertielle. Les microbulles oscilleront de manière chaotique, incohérente et incontrôlée, allant jusqu'à entraîner leur destruction et leur mise en commun (coalescence) pour former des particules de gaz de plus en plus volumineuses. On documente cet effet généralement à partir d'une pression ultrasonore aux alentours de 350 kPa⁴⁶.

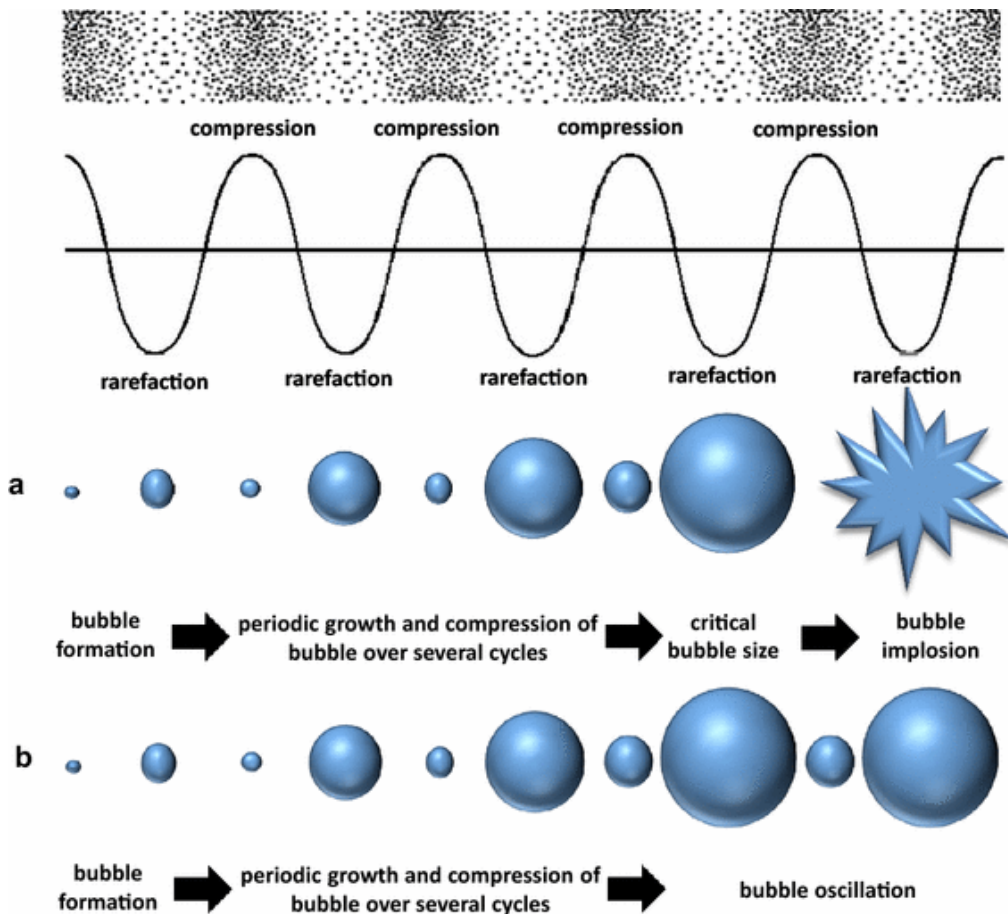


Figure 2.4 : Cavitation des microbulles en présence d'un champ ultrasonore. Cavitation stable (a) et inertielle (b). Adapté de Izadifar et al. (2018)⁴⁶

Il est important de noter qu'il existe une mesure des effets non-thermiques de l'effet des microbulles stimulées par ultrasons (donc principalement la cavitation des microbulles) sur les tissus environnants, l'index mécanique. Celui-ci est une quantification de la puissance du faisceau ultrasonore, calculée par la formule⁴⁷ :

$$M. I. = \frac{PNP}{\sqrt{f}} \quad 2.3$$

Où :

M.I. = Index mécanique (Mechanical Index);

PNP = la pression négative maximale (Peak Negative Pressure) (MPa);

f = la fréquence centrale de l'ultrason transmis (MHz);

La valeur maximale de M.I. approuvée par la FDA est de 1.9.

Utilisation diagnostique

Ces propriétés des microbulles en font donc des agents de contraste ultrasonores de choix. Injectées dans la circulation sanguine, les microbulles, plus petites qu'un globule rouge, se déplacent partout et jusqu'aux endroits d'intérêt à imager. L'imagerie de contraste (CEUS : Contrast enhanced ultrasound) sera donc tout indiquée pour mettre en évidence des problèmes de perfusion, mais aussi les structures des organes (les microbulles offrent un bon contraste entre les organes et le sang).

De plus, les microbulles peuvent être conçues pour se lier spécifiquement à certaines cibles moléculaires, qui s'exprimeront préférentiellement à la surface de l'endothélium de certains tissus. En effet, comme les bulles ne sont pas assez petites pour passer la barrière capillaire et pénétrer dans les tissus, l'imagerie moléculaire permet de quantifier et de localiser l'abondance du ligand d'intérêt dans la vascularisation²⁹. Ce type d'imagerie (Targeted CEUS) est particulièrement utile pour imager l'angiogenèse, l'inflammation ou encore l'athérosclérose⁴⁸.

Différents modes d'imagerie ultrasonores sont utilisés pour faire ressortir de manière plus prééminente les agents de contraste, en soustrayant les échos linéaires reflétés par les tissus^{49,50}.

Utilisations thérapeutiques

En plus d'une utilisation diagnostique de plus en plus routinière en clinique, les dernières années ont vu une explosion des utilisations thérapeutiques de la combinaison microbulles/ultrasons. Deux effets physiques créés par l'action des ultrasons sur les microbulles sont centraux pour la plupart des nombreuses réponses physiologiques engendrées. Tout d'abord, la cavitation, ou l'oscillation d'une microbulle sous l'effet d'un champ ultrasonore, peut entraîner différents effets sur les tissus environnants selon le type de cavitation⁵¹. Une cavitation stable induira des poussées/étirements des membranes cellulaires adjacentes, générant une augmentation de la perméabilité membranaire transitoire. Une cavitation inertielle se terminera bien souvent en destruction de la bulle, ce qui aura pour effet de créer des trous dans les cellules environnantes^{52,53}. La destruction des microbulles, conséquence de cette cavitation inertielle, engendre le deuxième phénomène physique important dans l'interaction microbulles et ultrasons : la sonoporation.

Bien que le mécanisme exact de la sonoporation ne semble pas encore tout à fait compris, la définition entendue de celle-ci est qu'elle consiste en la rupture temporaire des cellules ou tissus environnant la microbulle brisée suivant une onde de choc et un effet de « *jet stream* »⁵⁴⁻⁵⁶. En générant des pores temporaires dans les membranes cellulaires⁵⁷, l'éclatement de la microbulle suite à la cavitation inertielle permet de faire pénétrer dans les cellules d'intérêt des molécules n'ayant pas pu y rentrer autrement, car trop volumineuses. De plus, la cavitation à proximité des cellules endothéliales semble créer une hyperpolarisation de la membrane, favorisant un processus d'endocytose^{58,59}.

Ainsi, et comme les microbulles se font de plus en plus stables, une grande variété d'agents s'y voient adjoints, utilisant les microbulles comme vecteurs. Les avantages des techniques de MBSU (Microbulles stimulées par ultrasons) sont nombreux : la précision du largage ou de l'interaction des microbulles avec le milieu désiré, la livraison locale des composés d'intérêt et le faible risque

constitué par les bulles de gaz (biocompatibles et assez petites pour ne pas risquer d'embolisation) ainsi que par les ultrasons (index mécanique sous les valeurs dommageables).

Une recherche rapide sur www.pubmed.com a permis de constater à quel point la proportion d'articles publiés combinant ultrasons, microbulles et thérapie ne cesse d'augmenter : en effet, les articles avec le mot clé « therap* » ont pour la première fois dépassé 50% du total des articles contenant les mots-clés « ultrasound AND microbubble* » lors des 5 dernières années (2016-2020).

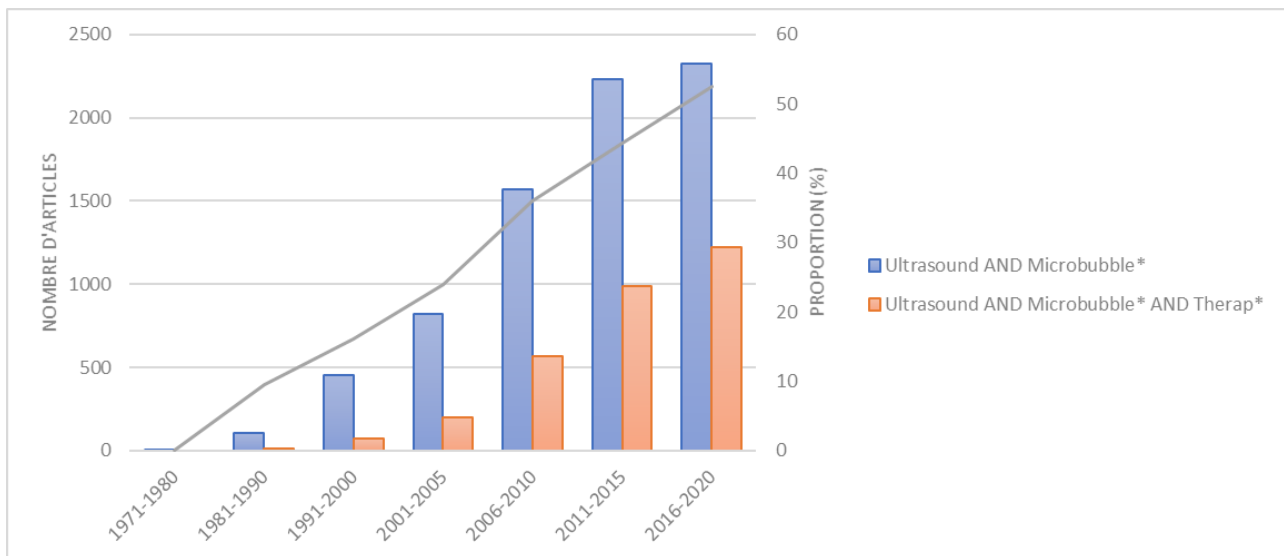


Figure 2.5 : Évolution des publications sur Pubmed sur les microbulles et ultrasons.

De nombreuses utilisations thérapeutiques des microbulles ont donc vu le jour, voici un bref survol des principales, avec un accent sur les thérapies appliquées au cancer.

Livraison ciblée

Comme décrit plus tôt, les microbulles sont des vecteurs idéaux pour plusieurs types de molécules suite à la sonoporation (création transitoire de pores dans la cellule). On distingue deux grandes catégories de largage ciblé sur lesquelles la littérature abonde, les thérapies géniques et les médicaments.

La composition lipidique de la plupart des enveloppes de microbulles facilite la liaison avec des molécules d'ADN : chargés négativement, les plasmides d'ADN créent des liens électrostatiques

avec plusieurs lipides qui possèdent des groupements positifs. De plus, l'ADN dans le complexe électrostatique est protégé de la dégradation enzymatique, ce qui permet d'augmenter l'efficacité de la transfection résultante comme plus d'ADN se rend à la cible. En comparaison, l'association de microbulles avec des fragments d'ADN permet d'éviter la possible réaction immunitaire qui pourrait être déclenchée par un vecteur viral⁶⁰. Plusieurs études ont prouvé l'efficacité de la thérapie génique par microbulles et ultrasons⁶¹⁻⁶³.

La livraison ciblée de médicaments peut quant à elle se faire de plusieurs façons, également abondamment répertoriées dans la littérature, principalement par sonoporation transitoire de cellules d'intérêt pour augmenter l'ingestion de molécules, et aussi via l'éclatement local de microbulles chargées préalablement avec la drogue voulue. La littérature est également abondante sur ce sujet⁶⁴.

Sonothrombolyse

La combinaison de microbulles et d'ultrasons dans la thrombolyse (bris d'un thrombus dans un vaisseau) a été démontré comme étant très efficace lorsque les bulles sont combinées à des agents fibrinolytiques, plus efficace que les drogues fibrinolytiques seules⁶⁵⁻⁶⁷. En plus de diminuer significativement la taille du thrombus, des études ont montré que les microbulles stimulées par ultrasons aideraient à la reperfusion de microvaisseaux avoisinants, ce qui est crucial dans la récupération d'un accident ischémique⁶⁸. Bien que partiellement compris, le mécanisme de fonctionnement de la sonothrombolyse semble être tant à la cavitation stable (érosion du thrombus⁶⁹) qu'à la cavitation inertielle (dommage au réseau de fibrine et onde de choc^{70,71}).

Ouverture de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (*BBB : Blood-Brain Barrier*) est une barrière physique à de nombreuses molécules; seules les plus petites parviennent à passer cette interface et à pénétrer dans le système nerveux central. Les cellules endothéliales qui le composent et reliées par des jonctions serrées évitent ainsi que des toxines ou des pathogènes n'affectent le cerveau. Cependant, cet obstacle prévient également la pénétration de médicaments destinés au SNC (système nerveux central), comme il s'agit de molécules de taille importante⁴⁵. Il a été démontré

que le traitement par ultrasons de microbulles circulant dans la vascularisation à proximité de la barrière hémato-encéphalique permettait d'augmenter la perméabilité de celle-ci, et ainsi la pénétration de molécules qui ne pouvaient y entrer autrement⁷²⁻⁷⁴.

Interactions thérapeutiques dans le traitement du cancer

Si l'utilisation des MBSU de manière thérapeutique prend son envol pour de nombreuses applications systémiques en général, quatre principales applications pour le traitement du cancer en particulier sont ici d'intérêt⁷⁵:

Thérapie sonodynamique

La thérapie sonodynamique consiste en l'utilisation d'agents sonosensibles tels l'hématoporphyrine et ses dérivés⁷⁶ afin d'engendrer, suite à une stimulation par MBSU, la création de radicaux libres. Les cascades moléculaires entraînées par ces-mêmes radicaux libres causeront des dommages irréparables aux cellules tumorales à proximité. Les effets de la thérapie sonodynamique ont été assez concluants sur différents types de tumeurs^{77,78}, entraînant une apoptose des cellules cancéreuses ainsi qu'une réduction de la croissance tumorale, en plus d'avoir un effet angio-destructeur.

Augmentation de la perméabilité vasculaire

L'augmentation de la perméabilité vasculaire permettant le largage ciblé de divers agents est l'une des voies les plus prometteuses des dernières années. En réponse à une stimulation ultrasonore de plus ou moins grande intensité, microbulles vont entrer en cavitation à proximité des cellules endothéliales, qui, laissant normalement très peu de choses passer entre elles, vont devenir temporairement plus perméables⁵⁴. Cela crée de petits pores temporaires, phénomène appelé sonoporation^{54,79,80} et favorisant l'endocytose. C'est cette faculté transitoire permettant le passage de molécules qui autrement auraient de la difficulté à pénétrer les cellules ou tissus d'intérêt qui est exploitée de bien des façons. La pénétration des drogues utilisées dans le traitement de différents cancers^{81,82} est limitée par la barrière physique du passage du sang aux tissus tumoraux, ce qui fait que l'une des façons les plus simples d'utiliser ce phénomène est

simplement de le combiner à des transporteurs d'agents chimiothérapeutiques (différentes nanoparticules, liposomes, micelles^{83,84}) et d'exploiter l'augmentation de la perméabilité momentanée créée par les MBSU. Il est également possible d'utiliser les microbulles en soi comme transporteurs, se basant sur le principe que les ultrasons qui les frapperont lorsqu'elles seront à l'endroit désiré entraîneront la relargue de la molécule d'intérêt^{85,86}. Certains groupes utilisent également les microbulles comme transporteurs d'acides nucléiques^{87,88} pour permettre une thérapie génique ciblée.

Immunothérapie

L'immunothérapie est aussi une des cibles des traitements par MBSU. De plus en plus ciblée pour le traitement du cancer, l'utilisation d'une combinaison de facteurs pour aider le système immunitaire à surmonter l'environnement tumoral est de plus en plus mis de l'avant⁸⁹. L'utilisation de microbulles comme transporteurs, tel que décrit plus haut, permettrait donc de livrer à des endroits cibles des substances immuno-stimulatrices (cytokines, acides nucléiques, anticorps, antigènes ...)⁹⁰. Des équipes se concentrent sur la transfection de gènes (vaccin anti-cancer)⁹¹ dans des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, d'autres utilisent par exemple l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique provoquée temporairement par la MBSU pour faire pénétrer des anticorps ciblant des métastases dans le cerveau⁹².

En plus d'agir comme vecteur, il a également été montré que la stimulation de microbulles par ultrasons entraîne également la différenciation et la maturation de cellules dendritiques⁹³ dans le microenvironnement tumoral. De plus, il semble que les traitements de MBSU promeuvent l'immunité tumorale médiée par les lymphocytes T, augmentant l'efficacité du ciblage de l'angiogenèse ou la réduction de la croissance tumorale^{94,95}.

Thérapie anti-vasculaire

Finalement, une des avenues principales utilisant les microbulles stimulées par ultrasons est le traitement anti-vasculaire. Tout comme pour le traitement de thérapie provasculaire, la vascularisation tumorale est ici l'élément clé. Dans le processus de développement « normal » d'une tumeur⁹⁶, celle-ci développe un réseau de vaisseaux qui lui sont propre pour alimenter les

cellules tumorales proliférant rapidement. Ces mêmes vaisseaux sont cependant assez chaotiques et mal organisés, en plus d'être moins bien définis⁹⁷, ce qui les rend plutôt fragiles. Si le projet de thérapie provasculaire par MBSU ici proposé vise cette même vascularisation dans le but d'augmenter l'afflux de sang (et donc de vasodilater), l'effet contraire est recherché dans les thérapies anti-vasculaires. Les ultrasons vont stimuler des bulles jusqu'à ce qu'elles entrent en cavitation stable (autour de leur fréquence de résonance) ou inertielle (vont jusqu'à se briser)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ces dynamiques ultrasons/bulles vont engendrer des effets biophysiques sur les cellules environnantes, entraînant une ischémie, voire une nécrose sur les cellules endothéliales¹⁰¹⁻¹⁰³.

La grande variabilité de paramètres ultrasonores utilisés rend difficile les conclusions quant aux différentes études menées, mais il semble que des ultrasons de plus forte intensité (plus grande pression, plus longs, fréquence plus faible) entraînent un effet anti-vasculaire ayant des effets synergistiques avec la radiothérapie. Citons cependant les travaux du groupe de G.J. Czarnota¹⁰⁴. Leurs travaux montrent un effet synergétique entre la thérapie MBSU antivasculaire et la radiothérapie, inhibant la croissance tumorale de manière plus importante que la radiothérapie seule. Dans le cadre de nos travaux, c'est au contraire un effet provasculaire qui est recherché en combinaison avec la radiothérapie.

MBSU et monoxyde d'azote

Il est également important de mentionner ici la cascade de relargue du monoxyde d'azote entraînée par la stimulation de microbulles par ultrasons, comme celle-ci est centrale au projet de thérapie provasculaire.

Les forces de cisaillement (*shear stress*) sont l'un des effets de la cavitation causée par des microbulles stimulées par une onde ultrasonore sur l'endothélium vasculaire qui y est soumis¹⁰⁵. Il est bien répertorié que ces forces de cisaillement entraînent un afflux de calcium dans la cellule¹⁰⁶, agoniste des enzymes de synthèse du monoxyde d'azote endothéliales (eNOS). Ces dernières vont accélérer la conversion de l'oxygène et de la L-arginine en NO et L-citruline¹⁰⁷.

Le monoxyde d'azote créé peut être impliqué dans une panoplie de cascades biologiques. Celui-ci peut entre autres agir comme neurotransmetteur¹⁰⁸, être un médiateur ON/OFF de l'apoptose¹⁰⁹, avoir un rôle dans la réponse immunitaire¹¹⁰ ou inhiber l'activation des

plaquettes¹¹¹. De plus, le NO peut entraîner une vasodilatation, et ainsi une augmentation de l'apport sanguin, suite à la liaison et l'activation de la guanylate cyclase qui transformera la GTP en cGMP. C'est ce second messager qui phosphorylera par la suite la myosine des cellules musculaires à proximité, entraînant une relaxation de celles-ci^{112,113}. L'effet vasodilatateur du monoxyde d'azote est celui qui sera mis de l'avant dans ce projet.

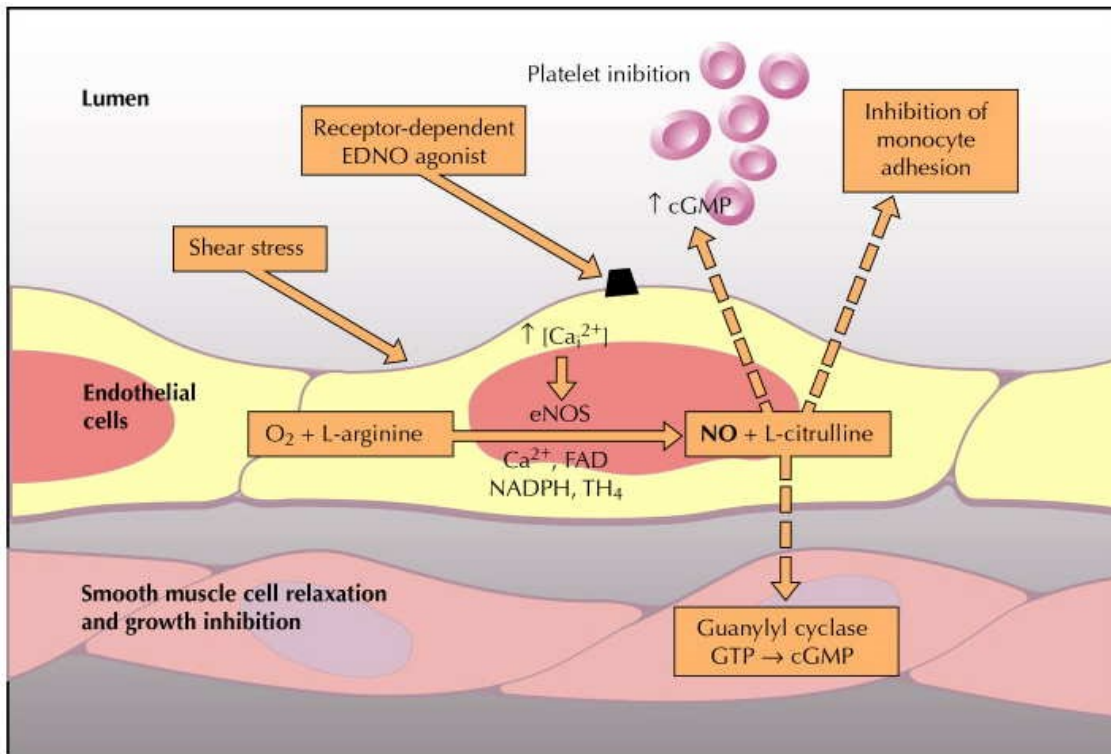


Figure 2.6 : Cascade de sécrétion du NO suite aux forces de cisaillement. Adapté de <https://medicalmyths.wordpress.com/atherosclerosis/> (consulté en juillet 2021)¹¹⁴

Les travaux phares de Yu et al. (2017) posent l'hypothèse que des microbulles stimulées par ultrasons dans un muscle ischémique entraîneraient un effet provasculaire (augmentation du flux sanguin) en raison d'une surproduction de NO en raison d'une activation des eNOS¹.

Trois conclusions de ce papier sont importantes pour la compréhension du projet de thérapie provasculaire anti-cancer :

- (1) Les microbulles stimulées par ultrasons (UTMD dans l'article) augmentent la phosphorylation (donc l'activation) des eNOS *in vitro*;

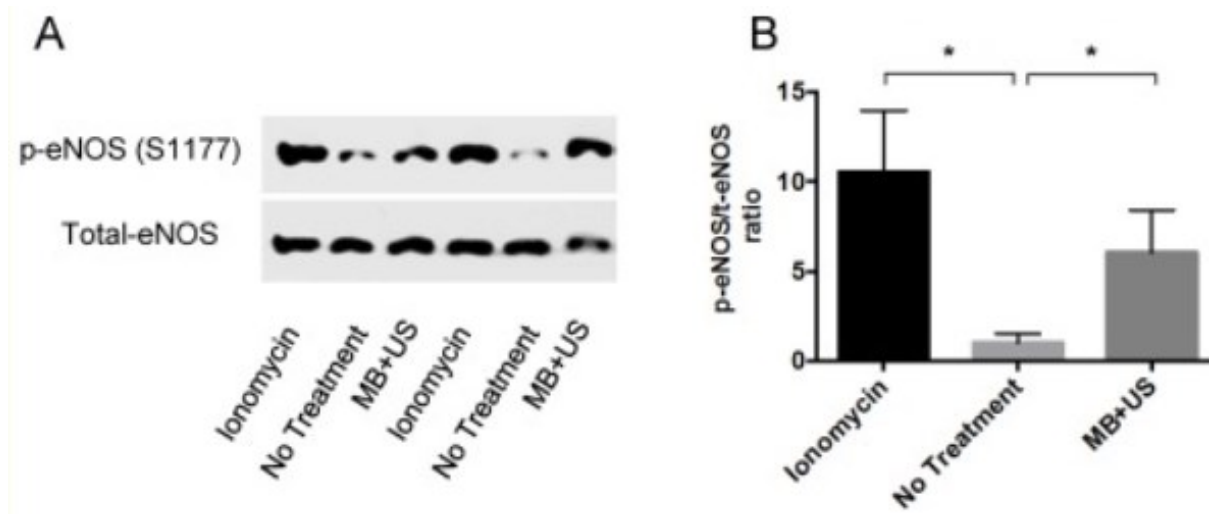


Figure 2.7 : Phosphorylation in vitro des eNOS : A. Western Blot des eNOS phosphorylées (p-eNOS; S1177) et des eNOS totales pour l'ionomycine (2 μ M; contrôle positif), le contrôle négatif (No treatment) et le traitement de microbulles (Definity™) et d'ultrasons (1 MHz, 1.5 MPa, 5000 cycles, chaque 3 secondes pendant 2 minutes) pour des cellules HUVECs; B. Ratio p-eNOS/t-eNOS (* $p < 0.05$; one-way ANOVA, Sidak post-hoc).¹

(2) Les microbulles stimulées par ultrasons (UTMD) augmentent la phosphorylation des eNOS et la production de NO in vivo;

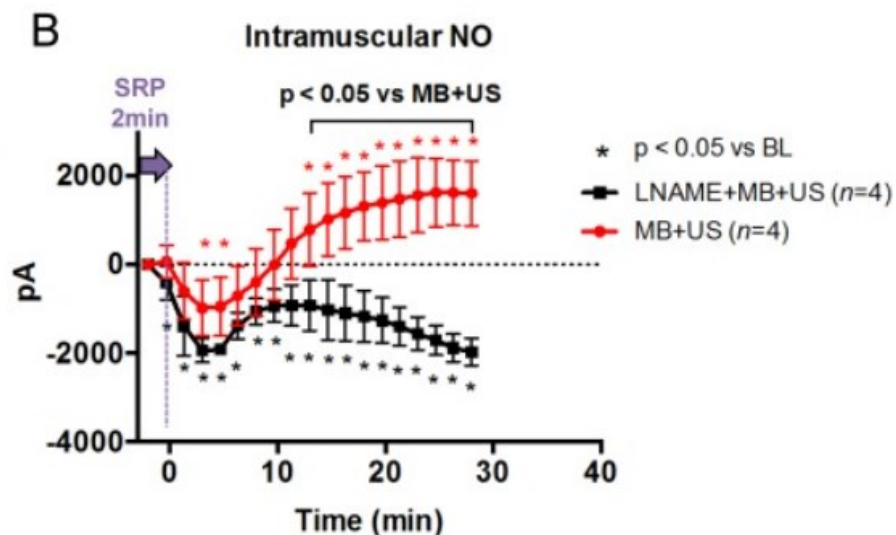
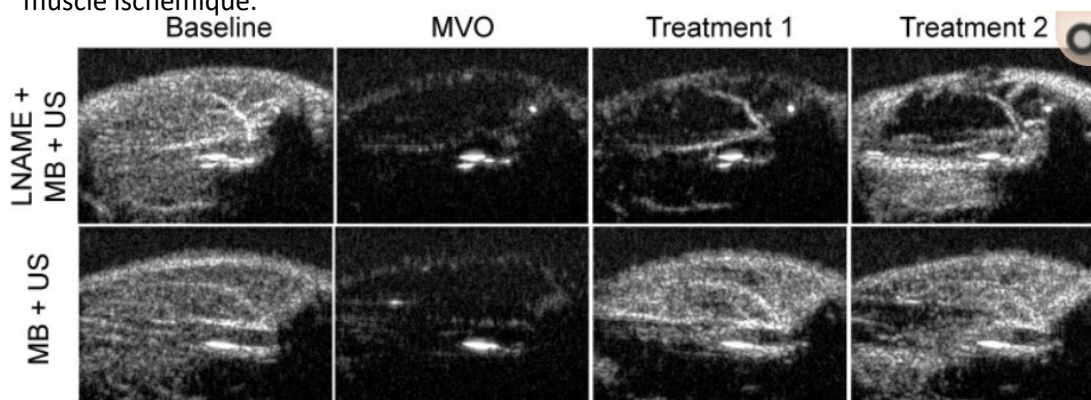


Figure 2.8 : Mesure du niveau de NO à la suite d'un traitement de MBSU (ligne mauve verticale : SRP = Sonoreperfusion; 1 MHz, 1.5 MPa, 5000 cycles, chaque 3 secondes pendant 2 minutes), avec ou sans LNAME (bloqueur de eNOS; 10 mg/kg, I.V.). On peut observer un effet soutenu d'augmentation du NO à partir de 2 minutes post traitement pour la courbe en rouge, et cet effet est significativement supérieur aux valeurs de départ après 13 minutes (* $p < 0.05$; two-way ANOVA, Sidak post-hoc).¹

(3) Les microbulles stimulées par ultrasons (UTMD dans l'article) augmentent la perfusion dans le muscle ischémique.



Sequoia, CPS 7, 0.2 MI, Burst mode at 1.9 MI for 5 frames

Figure 2.9 : Images de CEUS (Contrast Enhanced Ultrasound) prises 20 secondes après un « burst » (7 MHz, 5 MPa [M.I. = 1.9], 5 frames) ayant fait éclater toutes les bulles (Definity™; points blancs) circulantes. La deuxième colonne représente des muscles de rats avec une obstruction vasculaire provoquée (MVO = Microvascular Obstruction, solution formant des caillots). Les traitements 1 et 2 ont réussi à reperfuser le muscle ischémique entièrement lorsqu'il était traité avec MB + US (images du bas; 1 MHz, 1.5 MPa, 5000 cycles, chaque 3 secondes pendant 2 minutes), mais pas lorsqu'une co-injection de LNAME (bloqueur de eNOS; 10 mg/kg, I.V.) était effectuée (images du haut).¹

Ces travaux ont donc mis les fondations du projet de thérapie provasculaire, tel que décrites dans l'article présenté.

Donneurs de NO

De par l'effet vasodilatateur bien connu du monoxyde d'azote (NO), plusieurs stratégies ont été explorées pour tenter de déterminer comment maximiser son effet provasculaire pour augmenter l'efficacité de traitements de radiothérapie et de chimiothérapie¹¹⁵.

Plusieurs molécules ont été testées comme agents donneurs de NO (dinitrate d'isosorbide, nitroglycérine, nitroprusside de sodium, andmolsidomine pour ne nommer que celles-ci¹¹⁶), mais la réponse de la vascularisation tumorale était très variable selon la dose administrée, la nature de la tumeur et le mécanisme de genèse de NO. De plus, ces molécules ne ciblent pas la vascularisation tumorale de manière ciblée, ce qui peut entraîner l'effet « steal », comme discuté plus loin.

Également, des études ont démontré que la combinaison d'oxy-Hb (Hémoglobine oxygénée) et de NO, formant du SNO-Hb (S-nitrosohaemoglobin) qui est sélectif pour la livraison de NO aux tissus hypoxiques. Cela est possible en raison du changement de conformation de l'hémoglobine selon l'oxygénation des tissus environnants, passant d'un état R (relaxé) où l'hémoglobine emmagasine de l'oxygène en présence de fortes concentrations d'oxygène, à un état T (tendu) où l'hémoglobine relargue de l'oxygène dans un environnement à faible concentration en oxygène. Une telle affinité peut également être observée pour le NO, en faisant un véhicule idéal pour la relargue de celui-ci en milieu hypoxique¹¹⁷.

La co-administration de nitrite de sodium, qui agit comme donneur de NO dans les environnements hypoxiques et acides et augmente la production endogène de NO¹¹⁸⁻¹²⁰, a également été démontré comme étant prometteuse comme thérapie provasculaire. La conversion de nitrite en NO est favorisée par différentes molécules qui agissent comme des réductases de nitrite en situation hypoxique et dans un micro-environnement acide, entraînant une « vasodilatation hypoxique »^{121,122}. Le faible coût associé au nitrite de sodium ainsi que son profil de sécurité établi en fait un médiateur de choix pour les thérapies provasculaires. Il est cependant à noter que l'hétérogénéité de l'hypoxie et de l'acidité tumorale rend l'utilisation de nitrite et de SNO-Hb propice à beaucoup de variabilité.

MBSU et nitrite

Finalement, un autre papier clé au projet de thérapie provasculaire est celui de Yu et al. (2019) sur l'effet synergétique de l'administration de nitrite de sodium et de stimulation de microbulles par ultrasons¹²³. Ces travaux, réalisés par le même groupe dont était issu le papier présenté ci-dessus, montrent que le nitrite de sodium agit en synergie avec le traitement de MBSU pour augmenter la perfusion de manière encore plus significative que le traitement de MBSU seul.

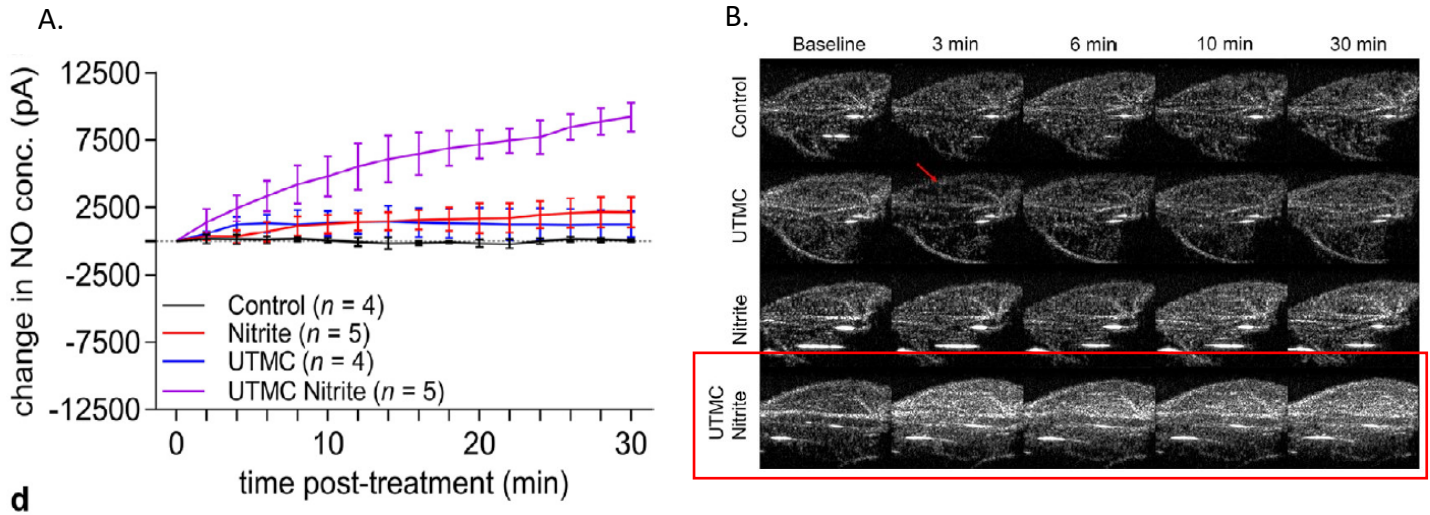


Figure 2.10 : Influence d'une co-injection de nitrite pour la thérapie de MBSU A. Changement dans la concentration de NO suite à différents traitements. Les animaux soumis à une co-injection de nitrite (4 mg/kg) avant UTMC (1 MHz, 1.5 MPa, 5000 cycles, chaque 3 secondes pendant 2 minutes) ont vu une augmentation significative de la concentration de NO par rapport aux autres conditions. B. Images de CEUS (Contrast Enhanced Ultrasound; 7 MHz, 5 MPa [M.I. = 1.9], 5 frames) prises à différent moment après traitement pour différentes conditions. La perfusion pour le groupe ayant reçu une co-injection de nitrite et le traitement de UTMC est visiblement augmentée en comparaison avec les autres groupes.¹²³

Cet effet synergétique dans le muscle sera exploré dans les travaux provasculaires tumoraux ici présentés.

Chapitre 3 – Cancer et traitements

Prévalence et importance

Le cancer est à ce jour l'un des problèmes de santé mondiale majeur. Près de 20 millions de personnes dans le monde ont été nouvellement diagnostiquées en 2020, et 9,9 millions en sont mortes. Chez les hommes, le cancer des poumons (14,3% des cas totaux) et de la prostate (14,1%) demeurent les plus diagnostiqués, tandis que le cancer du sein (24,5%) est le plus commun chez la femme¹²⁴.

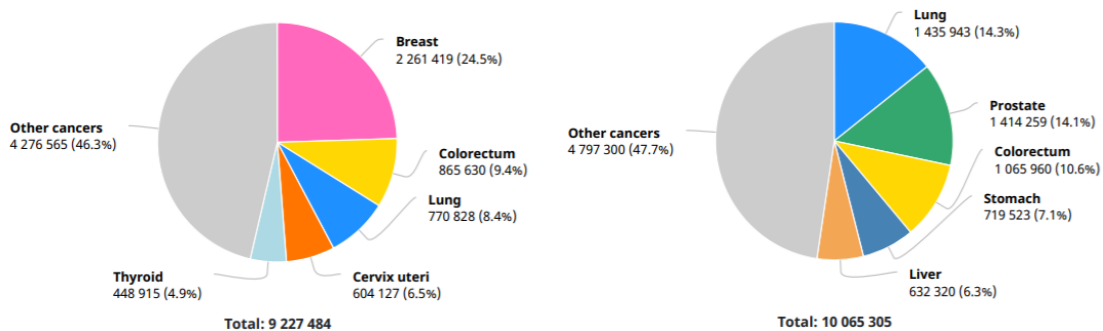


Figure 3.1 : Prévalence du cancer dans le monde en 2020 chez la femme (gauche) et l'homme (droite). Adapté de <https://gco.iarc.fr/> (Consulté en juillet 2021)¹²⁴

Bien qu'il s'agisse d'un terme très large, il est généralement convenu que le cancer décrit une maladie résultant d'une prolifération anormale des cellules, s'évadant du cycle normal de mort cellulaire attendu. Ces cellules vont donc proliférer, s'accumuler dans le corps et utiliser les nutriments et oxygène nécessaires aux cellules normales. Ces agglomérations de cellules vont former éventuellement chez les cancers solides des tumeurs, soit des masses de cellules cancéreuses plus ou moins bien définies.

Selon cette définition, il serait important de distinguer une tumeur bénigne d'une tumeur maligne. Toute tumeur, ou néoplasme, est une masse de cellules anormales, soit par une division excessive ou le fait que celles-ci ne meurent pas au moment attendu. Cependant, si cette masse de cellules a des bordures distinctes, pousse lentement et demeure dans son site primaire, on la

considère « bénigne », ce qui est normalement peu problématique. Une intervention chirurgicale peut être nécessaire pour éviter la douleur causée par la croissance de celles-ci et la compression de structures avoisinantes. Les tumeurs malignes quant à elles correspondent plutôt à la définition proposée plus haut du cancer. Il s'agit de tumeurs avec des cellules croissant de manière incontrôlable et se dispersant dans d'autres sites que le site primaire (créant des métastases). Le traitement varie selon la propagation de ces cellules; si la tumeur bénigne est détectée assez tôt, une simple chirurgie locale ou de la radiothérapie peut suffire. Cependant, si le cancer s'est répandu, un traitement systémique comme la chimiothérapie ou l'immunothérapie serait nécessaire¹²⁵.

De nombreuses causes peuvent causer les différents types de cancer connus à ce jour; si plusieurs facteurs de risque comme l'obésité, le fait de fumer, une mauvaise nutrition, la consommation d'alcool, la sédentarité peuvent augmenter la probabilité de développer un cancer, il est aussi maintenant compris que plusieurs facteurs de risque ne peuvent être prévenus, tel que l'âge et certaines prédispositions génétiques^{126,127}.

On convient cependant d'un certain nombre de caractéristiques biologiques clés du développement des cancers. Six attributs principaux avaient été définis au début des années 2000 comme étant cruciaux au développement tumoral : (1) conserver la signalisation proliférative, (2) éviter les suppresseurs de croissance, (3) résister à la mort cellulaire, (4) permettre l'immortalité répllicative, (5) induire l'angiogenèse et (6) activer l'invasion et les métastases¹²⁸. La recherche des années suivantes a permis de confirmer l'importance de ces caractéristiques, en plus d'en raffiner la définition. Il convient donc de rajouter à ces traits caractéristiques du cancer deux ajouts, (7) la reprogrammation du mécanisme énergétique et (8) l'évasion de la destruction immunitaire¹²⁹. Tous ces attributs sont des cibles de choix pour différents traitements du cancer.

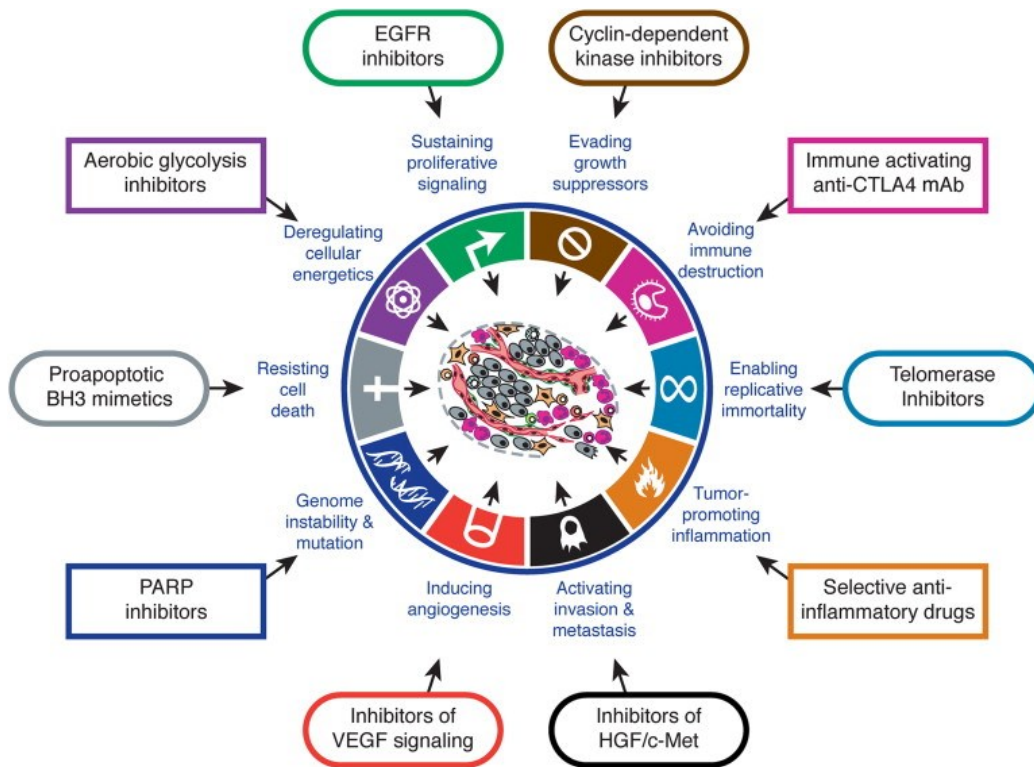


Figure 3.2 : Caractéristiques du cancer et cibles thérapeutiques associées. Adapté de Hanahan et Weinberg (2011) ¹²⁹

Il est donc maintenant bien connu que les besoins en énergie et nutriments à la tumeur ont une grande importance quant à la détermination éventuelle de l'évolution et du pronostic de la maladie. L'hypoxie en particulier dans le microenvironnement tumoral facilite la propagation tumorale et la survie des cellules cancéreuses¹³⁰. Celle-ci entraîne la formation de vaisseaux sanguins¹³¹, l'agressivité et le potentiel métastatique¹³²⁻¹³⁴ en plus d'entraîner une résistance aux traitements usuels, tel que décrit subséquemment.

Traitements

De par l'hétérogénéité des différents types de cancers, de leur origine, propagation et organes atteints, il est difficile, voire impossible, de circonscrire les traitements du cancer à une seule et unique branche thérapeutique. De plus, il est à noter qu'un changement de paradigme dans le traitement du cancer a été effectué au début du 21^e siècle¹³⁵. Si les cancers étaient précédemment traités principalement en se basant sur les organes d'origine et avec des chimiothérapies cytotoxiques sur des patients non-sélectionnés d'avance, un plateau fut atteint

et il est devenu évident dans les dernières années qu'une sélection préalable des traitements selon différents facteurs moléculaires est nécessaire. En ce sens, les thérapies pour le cancer ont pris un tournant moléculaire et biologique important, en mettant de l'avant le développement de techniques de profilage génétique et la découverte de marqueurs prédictifs génétiques. Cette nouvelle optique dans le traitement du cancer a mené dans les dernières années à l'oncologie de précision axée sur le génotype individuel, en plus de cibler des composantes clés du microenvironnement tumoral tel que les éléments du système immunitaire^{136,137}.

Les traitements du cancer sont donc de plus en plus dirigés vers une médecine de précision, en combinaison de plusieurs éléments, et personnalisée au patient. Voici donc brièvement un survol des techniques biologiques émanant des recherches des dernières années, ainsi que des avancées en chimiothérapie, pour enfin mener à la radiothérapie.

Thérapies biologiques

Blocage des points de contrôle immunitaires « *immune checkpoint blockade* »

Le fonctionnement général de ce type de thérapie est d'utiliser les points de contrôle normaux du système immunitaire dont la fonction habituelle est de prévenir l'amplification des réactions immunitaires du corps afin qu'elles ne réagissent pas contre les cellules saines de l'hôte. Des protéines à la surface des cellules T du système immunitaire « protéines de points de contrôle immunitaire » reconnaissent d'autres protéines sur d'autres cellules (par exemple des cellules tumorales). Lorsque la liaison entre ces deux protéines s'effectue, un signal « OFF » est envoyé, et prévient la destruction de la cellule saine par les cellules T. Les bloqueurs des points de contrôle immunitaires empêchent cette liaison, ce qui permet aux cellules T de tuer les cellules cancéreuses¹³⁸. Certains des exemples les plus connus de cette thérapie sont les médicaments bloquant la molécule CTLA-4, retrouvée sur les cellules T, ou encore ceux intervenant dans la liaison PD-1/PD-L1^{139,140}.

Thérapies cellulaires adaptatives

Les thérapies cellulaires adaptatives (*Adoptive Cell Therapy : ACT*) utilisent également la réponse du système immunitaire. De manière générale, des cellules T du patient sont récoltées et

amplifiées en laboratoire, pour ensuite lui être réinjectées. Il arrive que ces cellules T sont modifiées pour les rendre plus aptes à identifier et tuer les cellules cancéreuses¹⁴¹. Les thérapies ACT les plus connues sont celles avec des CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) où les cellules T sont modifiées afin d'exprimer un récepteur spécifique à une protéine de la tumeur¹⁴², ou les TIL (*Tumor Infiltrating Leucocyte*), des lymphocytes T et B ayant déjà pénétré dans la tumeur et qui se font amplifiés ex vivo et modifiés de façon à être encore plus efficace contre les cellules cancéreuses¹⁴³.

Vaccins anti-tumeurs

Comme tout vaccin, les vaccins anti-tumeurs se basent sur une stimulation du système immunitaire pour entraîner une production accrue d'anticorps. En temps normal, ceux-ci sont administrés de manière prophylactique afin de protéger le corps d'une infection potentielle. Un tel type de vaccin préventif est administré pour le VPH (Virus du Papillome Humain) et l'Hépatite B, pouvant au moyen d'une infection virale respectivement entraîner le développement de cancer du col de l'utérus et du foie^{144,145}. Cependant, les vaccins anti-tumeurs ne fonctionnent habituellement pas de manière préventive mais plutôt en réponse à des cellules cancéreuses déjà présentes dans le corps. Plusieurs essais cliniques pour différents cancers sont en cours, utilisant différentes composantes pour stimuler le système immunitaire comme des antigènes de cellules cancéreuses, des cellules dendritiques cultivées in vitro avec des cellules de cancer, des segments d'ADN de cellules cancéreuses, ou encore des cellules cancéreuses entières¹⁴⁶.

Virus oncolytiques

Les virus oncolytiques sont l'un des champs de recherche en plus forte croissance. Comme tous virus, ceux-ci nécessitent le métabolisme répliatif de cellules hôtes afin de se reproduire, avec cependant une préférence pour les cellules cancéreuses. En plus de mener à la destruction de la cellule lorsque les virus s'y sont reproduit en assez grand nombre pour aller infecter d'autres cellules, cet éclatement de la cellule mène à la relargue d'antigènes tumoraux pouvant être plus facilement repérés pour identifier les cellules cancéreuses¹⁴⁷. À ce jour, un seul vaccin a été approuvé par la FDA (*Food & Drug Administration*), le T-VEC, un virus HSV (*Herpes simplex virus*)

pour le traitement de mélanome métastatique ne pouvant être retirés chirurgicalement. De nombreux autres tests cliniques sont cependant en cours¹⁴⁸.

Inhibiteurs de kinases

Les kinases sont des enzymes permettant d'ajouter un groupement phosphate (PO_4^{3-}) à une protéine, généralement sur les résidus sérine, tyrosine ou thréonine. Cette phosphorylation permet de moduler l'activité de différentes cibles, et est impliquée dans de nombreux aspects de la fonction cellulaire et par le fait même du cancer¹⁴⁹. Par exemple, les cascades de signalisation des kinases sont impliquées dans plusieurs des caractéristiques du cancer énoncées plus haut, telles que la prolifération, la survie la motilité, le métabolisme, l'angiogenèse et l'évasion des réponses immunitaires anti-tumorales^{129,150}. De nombreuses molécules inhibant l'action de ces kinases ont réussi à démontrer un bénéfice clinique significatif¹⁵¹⁻¹⁵³.

Hormonothérapie

La surexpression de certaines hormones (notamment les hormones stéroïdiennes, qui sont des régulateurs de prolifération cellulaire et d'expression génique) peut parfois mener à une prolifération cellulaire incontrôlée, et augmente le risque de néoplasmes. Les tumeurs engendrées par ce déséquilibre hormonal (tumeurs malignes hormono-dépendantes) présentent généralement une forte expression de récepteurs hormonaux¹⁵⁴. Les cancers du sein, de l'endomètre, ainsi que les sarcomes utérins et les adénocarcinomes prostatiques sont des exemples communs de ce type de tumeur. La thérapie hormonale consiste généralement en l'administration exogène d'hormones pour interférer avec la production problématique d'hormones ou avec l'activité des récepteurs¹⁵⁵. De plus, il est à noter que certaines hormones comme les corticostéroïdes ont également une capacité d'induire l'apoptose et de down-réguler certains gènes, effet antiprolifératif recherché¹⁵⁶.

Traitements anti-angiogéniques

Différents traitements ciblant l'angiogenèse (la formation et croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) sont utilisés pour traiter différents cancers. En effet, les tumeurs nécessitent un apport constant d'oxygène et de nutriments à leurs cellules pour permettre croissance et prolifération; les cellules tumorales envoient des signaux chimiques pour stimuler cette croissance

vasculaire¹⁵⁷. Pour essayer de contrôler cette croissance, plusieurs traitements ciblent la voie angiogénique, visant à réduire l'apport sanguin à la tumeur, donc de nutriments¹⁵⁸. De nombreux agents inhibiteurs d'angiogenèse sont au banc d'essai, ciblant soit directement les cellules endothéliales tumorales (endostatine, arrestine, tumstatine, sémaphorine, Netrin)¹⁵⁹⁻¹⁶¹ ou indirectement via les cellules tumorales ou stromales associées (anti-VEGF, FGF,...)^{157,162,163}.

Chimiothérapie

La chimiothérapie est à ce jour, avec la radiothérapie et la chirurgie, l'un des traitements privilégiés du cancer. Celle-ci correspond à l'utilisation de médicaments pour tuer des cellules cancéreuses dans une panoplie de cancers, à différents stades de traitement. Plus d'une centaine d'agents chimiothérapeutiques sont connus à ce jour, utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres médicaments. Tout dépendant du type de cancer à traiter, la chimiothérapie peut être la voie de traitement unique à privilégier, ou être utilisée en combinaison avec d'autres types de traitement, comme la radiothérapie. De manière usuelle, la chimiothérapie s'attaque aux cellules à croissance et progression rapide, sans distinction pour les cellules saines ou cancéreuses : c'est ce qui engendre par exemple des pertes de cheveux, comme les follicules pileux se renouvellent rapidement.

Plusieurs types d'agents chimiothérapeutiques sont utilisés au quotidien, regroupés en classe selon leur mode d'action. Les plus communs incluent les agents de dommage à l'ADN, les antimétabolites, les antimitotiques, les antibiotiques anti-tumeurs et les inhibiteurs d'enzymes de réparation d'ADN¹⁶⁴.

Si la chimiothérapie systémique continue d'être utilisée de manière généralisée en clinique, ses inconvénients sont de plus en plus critiqués au profit des traitements de médecine de précision. Comme les agents cytotoxiques utilisés ciblent le cycle cellulaire sans distinction pour les cellules saines ou tumorales, celle-ci entraîne bien souvent des toxicités aiguës immédiates et des toxicités chroniques à long terme sur de nombreux organes, en plus d'entraîner des effets indésirables comme l'infertilité, la résistance accrue aux médicaments et la carcinogénicité¹⁶⁵. De plus, la chimiothérapie n'entraîne pas pour tous les cancers un effet curatif, mais ne fait que

prolonger la survie; c'est souvent pourquoi celle-ci est souvent administrée de manière palliative¹⁶⁶.

C'est donc dans cette optique que s'inscrivent le développement de thérapies ciblées, cherchant à minimiser les effets négatifs sur les tissus sains tout en attaquant spécifiquement les tumeurs. En plus des différentes avancées biologiques explorées plus haut, l'amélioration des techniques déjà utilisées de manière routinière en clinique, comme la radiothérapie, est particulièrement attrayante.

Radiothérapie

Utilisée comme traitement ou en combinaison dans presque les deux tiers des cancers¹⁶⁷ dans le monde occidental, la radiothérapie se montre assez efficace et un choix privilégié par les cliniciens comme avenue thérapeutique. De grandes avancées ont été effectuées dans les dernières années quant à l'augmentation de la précision et de la personnalisation des traitements¹⁶⁸, mais le succès de celle-ci demeure limité par 1) la dose maximale tolérée par les tissus sains environnants et 2) la résistance intrinsèque à la radiothérapie. Si la résistance à la radiothérapie peut être attribuable à une panoplie de facteurs conséquents à l'hétérogénéité des différents types de cancers, telle l'hypoxie discutée précédemment, la dose maximale de radiation acceptable pour les tissus normaux à proximité de la tumeur (toxicité des tissus sains) est un facteur constant et important dans l'orientation des traitements par radiothérapie. C'est pourquoi de nombreuses recherches visent maintenant à diminuer les doses de radiation atteignant la tumeur et ses alentours¹⁶⁹⁻¹⁷¹, minimisant les effets secondaires nocifs à long terme.

Principe

La radiothérapie, ou thérapie par radiation, est un agent physique utilisé pour détruire les cellules cancéreuses. Quelques sous-types de radiothérapie comme la curiethérapie (source de radiothérapie interne scellée) ou la thérapie par radionucléide (source de radiothérapie interne non scellée) existent, mais l'emploi du terme radiothérapie se concentrera ici pour la suite principalement à la radiothérapie externe, source la plus communément utilisée en clinique.

La radiothérapie externe consiste habituellement en la génération et la focalisation d'un faisceau d'électrons ou de rayons X (donc de photons) sur une source à irradier. De manière beaucoup moins commune, dans le cadre de thérapie par particules, ce faisceau peut être composé de hadrons comme des protons, neutrons ou ions lourds. Cependant, ce type de traitement est à ce jour assez rare, comme il s'agit d'équipement encombrant et dispendieux¹⁷². L'unité de base de la dose de radiation absorbée est le Gray (Gy), correspondant à la quantité d'énergie (joules) absorbée par unité de masse (kg).

Le faisceau de radiation dirigé vers la cible affecte l'ADN des cellules cibles soit par ionisation directe ou indirecte. L'ionisation directe crée des bris à l'ADN, tandis que l'ionisation indirecte, qui compte pour le deux-tiers des dommages induits par la radiothérapie, interagit avec les molécules d'eau ou d'oxygène pour former des paires d'ions et d'espèces réactives à l'oxygène (*ROS : Reactive Oxygen Species*) comme l'anion superoxyde (O_2^-), des radicaux hydroxyls ($OH\bullet$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)¹⁷³.

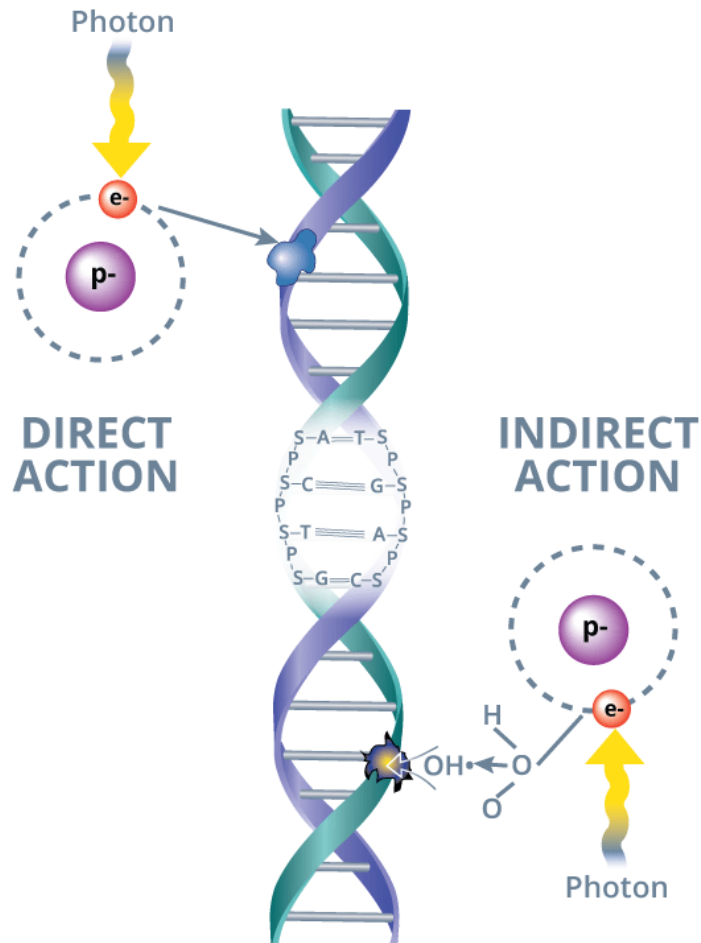


Figure 3.3 : Mécanismes biologiques d'action de la radiothérapie. Adapté de <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce572/effects-of-high-dose-ionizing-radiation>, consulté en juillet 2021¹⁷⁴

L'ionisation indirecte survient principalement au moyen de deux interactions importantes entre les photons et les tissus, soit l'effet photoélectrique et l'effet Compton. L'effet photoélectrique est la conséquence d'un photon entrant en collision avec un électron bien lié. Le photon disparaît et transfère toute son énergie à l'électron qui se voit éjecté de son orbitale, pour aller ioniser d'autres molécules environnantes. L'effet Compton, le plus commun en radiothérapie, survient quant à lui lorsqu'un photon entre en contact avec un électron libre. Le photon transmet un certain niveau d'énergie à l'électron, mais continue également d'exister, à un plus faible niveau énergétique. Photon et électron pourront alors continuer de se disperser et exercer d'autres interactions sur d'autres électrons libres ou ioniser des molécules¹⁷⁵.

La formation de ROS entraîne des dommages à l'ADN bien souvent irréparables de plusieurs façons. Ils peuvent créer des adduits et oxyder les bases de nucléotides qui, lorsque non réparées et survenant sur les deux brins, peuvent engendrer des bris double brin, source de dommages bien souvent irréparables entraînant la mort cellulaire¹⁷⁶. Ils peuvent également s'accumuler dans l'ADN mitochondrial et mener à sa dégradation, peroxyder des lipides membranaires ayant pour effet d'altérer la perméabilité de sa membrane, affecter la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie et entraîner un repliement inadéquat de protéines essentielles au bon fonctionnement de la cellule¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. De plus, en présence d'un niveau élevé de ROS, le facteur de transcription p53 semble augmenter le niveau de stress oxydatif via différentes cascades et contribue encore plus aux dommages cellulaires¹⁷³.

Il est important de noter que les cellules tumorales ont habituellement une capacité réduite de réparation des dommages à l'ADN^{180,181}, ce qui engendre une sélectivité naturelle des cellules affectées de manière permanente par la radiothérapie; en effet, les cellules saines auront la machinerie de réparation suffisante pour surmonter les dommages causés par la radiation. Ce sera bien souvent au moment de réparer un bris simple brin que la machinerie inefficace créera un bris double brin fatal^{182,183}.

Un traitement de radiothérapie efficace nécessite donc la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) principalement produites par les mitochondries, consommatrices de l'essentiel de l'O₂^{184,185}. Une déficience dans l'apport en oxygène à la tumeur (lorsque la pO₂ passe sous la barre des 10 mmHg^{186,187}) est donc un obstacle majeur au succès de la radiothérapie, comme décrit plus loin.

Agents d'amélioration d'efficacité de la radiothérapie

Bien que générant globalement de très bons résultats quant au traitement de la maladie, l'allègement de symptômes, et l'augmentation de la survie à long terme, l'efficacité de la radiothérapie demeure limitée par 1) la dose maximale tolérée par les tissus sains environnants et 2) la résistance intrinsèque à la radiothérapie, qui peut être attribuée à une multitude de facteurs qui varient selon le type de cancer; l'hypoxie en fait partie.

Dans les dernières années, c'est sur ces deux avenues principales d'amélioration de la radiothérapie que se concentre la recherche. Si certains se concentrent sur l'amélioration de la technologie en soi, permettant de donner des doses plus précises (Radiothérapie par Modulation d'Intensité [IMRT], Radiothérapie Stéréotaxique [SBRT], Radiothérapie Guidée par Imagerie [IGRT])¹⁸⁸, d'autres stratégies ont également été explorées par différentes équipes de recherche pour diminuer la radiorésistance ou augmenter la radiosensibilité tumorale. Quelques travaux phares concernant cette deuxième avenue seront ici détaillés.

Biomarqueurs de sensibilité à la radiation

Le ciblage de biomarqueurs de sensibilité à la radiation est l'une des options exploitées par plusieurs groupes. Certains se concentrent sur l'augmentation ou la réduction d'antioxydants intracellulaires (glutathion, thioredoxine, superoxide dismutase) pour respectivement protéger du dommage à la radiothérapie ou augmenter la sensibilité à celle-ci¹⁸⁹, d'autres visent plutôt à moduler l'expression de modulateurs de ROS, tels que le curcumin¹⁹⁰ ou le parthenolide¹⁹¹ permettant d'augmenter le potentiel redox des cellules cancéreuses, ou encore cherchent à déréguler le métabolisme de cellules cancéreuses par des mutations génétiques pour augmenter la production de ROS¹⁹². De plus, des « scavengers » de radicaux libres ont été développés en tant qu'agents radioprotecteurs, mais ne sont pas encore beaucoup utilisés, comme la voie d'administration limitée et la toxicité secondaire causent problème¹⁹³.

Inflammation

Quelques autres groupes cherchent aussi à exploiter la relation entre l'inflammation et la progression tumorale : il est connu que la radiosensibilité peut être promue par les inflammasomes¹⁹⁴, groupe de protéines assemblé suite à la reconnaissance de signaux inflammatoires. Lorsque détectés par certains groupes de molécules, dont les ROS, les cellules enclenchent un programme de mort cellulaire programmée (pyroptose). En plus d'accélérer la mort cellulaire consécutive à la radiation, les inflammasomes eux-mêmes peuvent résulter de la radiation, ce qui en fait une rétroaction positive permettant de radiosensibiliser les tumeurs¹⁹⁵.

Génomique

La génomique du cancer est également une branche de plus en plus étudiée pour contrer ou du moins minimiser la radiorésistance. L'augmentation de la radiosensibilité par le ciblage des voies de réparation du dommage à l'ADN suite à la radiothérapie est l'une des façons de rendre la tumeur d'intérêt plus radio sensible. Certaines mutations sont d'intérêt pour permettre d'éviter la réparation des cellules cancéreuses suite à la radiation ionisante, telles BRCA1 (gène du cancer du sein codant pour la réparation des bris à l'ADN double brin)¹⁹⁶, les PARP (réparation des bris simple brin)¹⁹⁷ ou encore Hsp90 (protéine corrigeant le repliement erroné d'autres protéines)¹⁹⁸.

De plus, des avancées récentes dans le monde du séquençage et de la bio-informatique ont permis de mettre en lumière des signatures génétiques permettant de prédire (ou du moins d'orienter) la réponse à la radiothérapie. En effet, ces techniques permettent de mettre de l'avant un ensemble de gènes prédisposant à la résistance à la radiothérapie (principalement associés à la réparation de dommages double-brins)¹⁹⁹ ou encore des mécanismes épigénétiques également associés à un moins bon succès post-radiation²⁰⁰.

Immunité tumorale

Finalement, la modulation de l'immunité tumorale pour augmenter la sensibilité à la radiothérapie est de plus en plus explorée. De récents travaux ont mis de l'avant le fait que la radiation peut entraîner une panoplie de réponses immunitaires (*up*-régulation d'effecteurs immuns positifs, *down*-régulation de l'expression de facteurs associés à la suppression tumorale) affectant subséquentement la réponse à la radiothérapie^{201,202}. Une grande variété d'agents ont été testés en combinaison avec la radiothérapie, dont CMH-1 (effecteur immunitaire permettant l'activation de cellules T CD8+ cytotoxiques). Celui-ci est souvent silencé chez plusieurs cellules tumorales, permettant d'éviter les dommages possiblement engendrés par un afflux de cellules CD8+. Des stratégies permettant une augmentation de son expression (largage par gènes de β -2 microglobuline²⁰³, radiation γ ²⁰⁴) ont été mises sur pied. Il est à noter que des effets synergétiques de la radiothérapie avec des « immune checkpoint inhibitors », le blocage par anticorps de régulateurs immuns, ont été rapporté, notamment en utilisant des anticorps visant CTLA-4²⁰⁵ ou PD-1/PD-L1²⁰⁶. De nombreux essais cliniques sont présentement en cours.

Métabolisme oxydatif

Le stress oxydatif des cellules est également l'un des composants clé de la réponse à la radiothérapie. Un fin équilibre entre les ROS et leur suppression par des enzymes antioxydantes est nécessaire pour que les cellules n'entrent pas dans un état de stress oxydatif²⁰⁷. Plusieurs études ont démontré que les cellules échappant à ce stress pouvaient entraîner le développement de radiorésistance^{208,209}. En ce sens, des thérapies jouant sur cette balance pour augmenter le stress oxydatif mitochondrial ont démontré un effet d'augmentation de la radiosensibilité, par exemple en précipitant l'accumulation rapide de ROS, de calcium, et l'activation de processus apoptotiques²¹⁰ ou en augmentant les niveaux de céramides (ce qui active les processus apoptotiques consécutifs aux caspases)²¹¹.

Vascularisation tumorale et hypoxie

Conséquence d'une vascularisation tumorale chaotique, dysfonctionnelle, et fuyante, l'hypoxie est la résultante d'un apport insuffisant de sang aux cellules, donc d'oxygène, distribué inégalement dans les tumeurs²¹²⁻²¹⁴. Des fluctuations irrégulières du niveau d'oxygène surviennent dans les tissus tumoraux^{215,216}, avec un déficit en oxygène variable d'un cancer à l'autre.

Deux types d'hypoxie (dont les définitions peuvent être un peu variables selon la littérature) peuvent être distingués : l'hypoxie aiguë (longitudinale, de perfusion ou cyclique), et l'hypoxie chronique (transversale ou de diffusion)²¹⁷, qui affectent toutes deux la réponse aux traitements et l'agressivité tumorale. L'hypoxie aiguë est réversible, et est issue d'une exposition à court terme à un faible niveau d'oxygène peut être conséquence de soit : 1) l'effondrement des vaisseaux tumoraux dans des régions à forte pression interstitielle; 2) le colmatage de vaisseaux par une agrégation leucocytaire; 3) la présence de cellules endothéliales dans la lumière des vaisseaux tumoraux; 4) des changements dans la viscosité sanguine en raison d'instabilités dans le flux de globules rouges^{218,219}. En ce sens, l'hypoxie aiguë représente un portrait du niveau d'oxygénation des tissus à un moment précis. Cette condition cyclique et analogue au va-et-vient des marées, peut aller jusqu'à 72 heures²²⁰. Ce type d'hypoxie est associé à une plus grande agressivité tumorale, via l'induction de métastases spontanées²²¹. L'hypoxie chronique, pour sa

part, est limitée par la diffusion de l'oxygène dans les tissus. Celle-ci s'instaure généralement dans des régions où la distance entre les vaisseaux et les cellules tumorales est grande, conséquence d'une expansion plus rapide du tissu tumoral au détriment de la vascularisation qui le supporte. Ce type d'hypoxie peut s'installer pendant plusieurs semaines, ce qui mène bien souvent à la mort cellulaire suite à des dommages irréversibles à l'ADN entraînant la mutagenèse et une instabilité génétique²²²⁻²²⁴.

L'hypoxie constitue donc une barrière importante à plusieurs traitements anti-cancer. Comme vu précédemment, le mécanisme d'action principal de la radiothérapie étant la formation d'espèces réactives à l'oxygène, causant des dommages irréparables à l'ADN des cellules cibles²²⁵, les tumeurs hypoxiques seront radio-résistantes.

De plus, certains agents thérapeutiques chimiques ne sont pas délivrés aussi efficacement dans un milieu hypoxique que normoxique. Une barrière de diffusion entre les vaisseaux principaux et les vaisseaux tumoraux se crée et engendre des problèmes de largage des médicaments aux cellules cibles²²⁶.

Finalement, l'hypoxie s'avère également être une barrière non-négligeable aux traitements du cancer par immunothérapie. En effet, cette voie de traitement, toute aussi récente que prometteuse, se voit inhibée par la glycolyse anaérobie (lorsqu'il y a peu d'oxygène), résultant en une surproduction d'adénosine, puissant suppresseur de cellules T, excrété par les cellules tumorales dans la matrice extracellulaire²²⁷. De plus, la protéine HIF-1 α , connue comme étant surexprimée en présence d'hypoxie, possède une faculté inhibitrice des cellules du système immunitaire adaptatif²²⁸.

Agents anti-hypoxique

En ce sens, plusieurs stratégies pour surmonter l'hypoxie tumorale ont vu le jour, mais sans succès particulièrement probant jusqu'à maintenant.

HAPs (Hypoxia-Activated Prodrugs)

Le développement de HAPs (Hypoxia-Activated Prodrugs) a longtemps été considéré comme prometteur. Ces agents, inactifs en conditions normales mais réduits par des enzymes en

condition hypoxique pour générer des espèces cytotoxiques, seraient en fait des médicaments dont l'efficacité se verrait augmenter en région hypoxique²²⁹. Cependant, à ce jour, malgré plusieurs décennies de travail sur le sujet, aucun HAP n'est en ce moment approuvé pour utilisation clinique.

Oxygène hyperbarique (HBO)

La respiration d'oxygène hyperbarique (HBO) est également une option considérée par certaines équipes pour augmenter l'apport de sang à des régions hypoxiques. Si la respiration d'O₂ à pression ambiante plus élevée a montré des résultats encourageants dans quelques études^{230,231}, d'autres ont mis de l'avant un taux élevé de complications suite à la combinaison d'HBO avec de la radiothérapie, telles des nécroses de radiation ou des crises d'épilepsie²³². D'autres techniques également avec des résultats mitigés ont été expérimentées pour livrer directement de l'oxygène à la tumeur, notamment des transfusions d'érythrocytes²³³ ainsi que de l'administration d'érythropoïétine²³⁴.

Agents modificateurs allostériques de l'hémoglobine

Une autre approche testée est l'utilisation d'agents modificateurs allostériques de l'hémoglobine²³⁵. En réduisant l'affinité de l'oxygène à l'hémoglobine, les agents en question augmenteraient la relargue d'oxygène, et donc sa disponibilité. Les essais cliniques ont été discontinués suite à un manque de preuve d'amélioration de la survie²³⁶.

Molécules augmentant la diffusion de l'oxygène

Également, l'étude de certaines molécules visant à augmenter la diffusion de l'oxygène est présentement en cours. Le TSC (Trans Sodium Crocetinate), kosmotrope menant à des changements dans le plasma sanguin pour permettre la diffusion plus rapide de l'oxygène des globules rouges à la paroi vasculaire, semble montrer des résultats encourageants en combinaison avec différents traitements de chimiothérapie²³⁷.

Thérapies génétiques

Des thérapies génétiques ont aussi été mises sur pied afin d'essayer de combattre l'hypoxie. Celles-ci se basent sur le développement de promoteurs dépendants de l'expression de HIF-1²³⁸.

Ce même promoteur est inséré dans la séquence codante d'un gène suicide convertissant une prodrogue en drogue toxique, expression dépendante de la présence de HIF-1. Les effets sur l'augmentation de l'efficacité de la radiothérapie semblaient encourageants²³⁹, mais n'ont pas eu de suite clinique.

Agents induisant une vasodilatation tumeur-sélective

Quelques procédés ont également été mis à l'essai pour entraîner une vasodilatation spécifique aux vaisseaux tumoraux. En effet, une telle augmentation du flot sanguin permettrait d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie (dépendant de l'oxygène aux tissus tumoraux) et de la chimiothérapie (dépendant de la perfusion de la région traitée)²¹⁸. D'intérêt, notons les inhibiteurs du récepteur de l'endothéline (BQ123)²⁴⁰, les radiations ionisantes (via l'activation des eNOS)²⁴¹ ou l'hyperthermie localisée²⁴².

Agents de transport d'oxygène

Finalement, des agents de transport d'oxygène sont développés pour diminuer l'hypoxie tumorale. Deux principaux types sont à ce jour mis de l'avant, soit les agents utilisant l'hémoglobine et ceux utilisant des fluorocarbones (FCs). Les agents à base d'hémoglobine sont préparés via de nombreuses méthodes, telles que la conjugaison avec différents polymères, la modification génétique, l'encapsulation dans des liposomes. Cependant, bien que plusieurs démontrent une réduction de l'hypoxie tumorale^{243,244}, certaines questions se soulèvent quant à la non-linéarité de la courbe de dose-réponse.

L'une des options les plus prometteuses est l'utilisation d'agents à base de FC stabilisés dans une émulsion. Ceux-ci peuvent dissoudre d'importantes quantités d'oxygène, simplement par diffusion suivant un gradient de concentration, ce qui leur permet de livrer de l'oxygène aux zones hypoxiques par diffusion passive²⁴⁵. Contrairement aux agents utilisant l'hémoglobine, la solubilité de l'oxygène est directement proportionnelle à la pression partielle de celui-ci. En ce sens, l'O₂ peut facilement et rapidement en être extrait. De plus, il n'est pas limité par la capacité de liaison de l'hémoglobine. Plusieurs agents à base de FC semblent prometteurs, mais les essais cliniques menés à ce jour nécessitent de hautes concentrations de l'agent pour démontrer l'efficacité du traitement, menant à des effets adverses indésirables^{246,247}.

Section II : Article et compléments

Chapitre 4 – Objectifs

Projet de thérapie provasculaire : hypothèses

Le projet de thérapie provasculaire anti-cancer à l'aide de microbulles stimulées par ultrasons s'inscrit au croisement de plusieurs éléments explorés dans la revue de littérature. Avec comme objectif ultime l'augmentation de l'efficacité de la radiothérapie, cette thérapie vise à réduire temporairement et localement l'hypoxie tumorale en augmentant l'afflux sanguin à la tumeur, et donc d'oxygène. Pour ce faire, le projet de thérapie provasculaire s'appuie sur une injection préalable de nitrite de sodium (agent synergétique) suivi d'une thérapie de microbulles stimulées par ultrasons.

Trois hypothèses de départ ont donc été élaborées :

- (1) La combinaison de MBSU et de nitrite permet d'augmenter la perfusion dans le muscle de souris;
- (2) La combinaison de MBSU et de nitrite permet d'augmenter la perfusion dans un modèle tumoral murin;
- (3) La réponse provasculaire engendrée par le traitement de MBSU et de nitrite entraîne une augmentation de l'efficacité de la radiothérapie.

Écueils d'autres techniques similaires

Comme exploré dans les précédents chapitres, différentes techniques ont été élaborées dans les dernières années pour contourner certains aspects centraux au projet de la thérapie provasculaire. Cependant, celle-ci demeure des plus pertinentes en raison de nombreux avantages qu'elle offre lorsque comparée aux travaux présentés plus tôt. Voici un bref survol des principaux désavantages encourus par ces méthodes.

Agents anti-hypoxiques

Le projet de thérapie provasculaire n'utilisant aucun agent chimique nécessitant une quelconque homologation ou pouvant entraîner des effets indésirables, la plupart des barrières aux agents

énoncés ci-dessus ne s'appliquent pas. Les microbulles étant pour leur part utilisées depuis plusieurs années comme agents de contraste lors d'examens d'échographie cliniques routiniers, leur utilisation a été prouvée ne mener que très rarement à des effets adverses. Cependant, il est à noter que des complications sont subvenues chez certains patients avec des hypersensibilités au perflutène ou des conditions cardiopulmonaires instables. Ceci étant dit, les microbulles Definity™ utilisées ont été approuvées chez les patients humains²⁴⁸. De plus, les ultrasons utilisés se situent dans une fourchette sans dommage pour les humains : en effet, la FDA recommande l'utilisation d'ultrasons sous un index mécanique (M.I.) de 1.9⁴⁷, les pulses utilisés sont donc sans dommage tissulaire (index mécanique de 0.1 à 0.8 dans les tests préalables). L'homologation des microbulles permettant donc une utilisation immédiate, la technique de thérapie provasculaire peut donc s'appliquer rapidement et sans danger à un retour temporaire à la normoxie chez les tumeurs, le temps des traitements de radiothérapie.

Agents améliorant l'efficacité de la radiothérapie

Bien que de nombreuses études mentionnées précédemment semblent prometteuses à long terme, le projet de thérapie provasculaire par MBSU se distingue par sa facilité d'exécution, le côté localisé et temporaire, son faible coût ainsi que la translation clinique aisée. En effet, plusieurs des études mentionnées dans la dernière section demandent l'élaboration de drogues (dispendieux) devant être approuvées cliniquement (long processus). Le projet de thérapie provasculaire étant très simple et tous les composants approuvés à l'utilisation humaine, l'application humaine ne consiste pas une barrière. Également, l'utilisation de modifications génétiques ou de biomarqueurs systémiques par exemple pourrait entraîner des effets négatifs à long terme sur des régions non visées par le traitement. Le manque de spécificité physiologique de tels traitements pourrait résulter en de nouveaux effets secondaires non désirables, ce que le traitement de MBSU n'engendre pas en raison de sa grande spécificité spatiale et de la courte durée de la modification physiologique, qui en soi n'est pas dommageable (simple vasodilatation locale).

Combinaisons thérapeutiques antitumorales microbulles et ultrasons

Le projet de thérapie provasculaire, bien qu'utilisant la stimulation de microbulles par ultrasons comme les travaux précédemment décrits, se distingue par la simplicité et le potentiel combinatoire avec d'autres agents antitumoraux. En effet, si les différentes avenues décrites plus haut semblent pour la plupart être encourageantes, le projet ici mis de l'avant offre une option synergétique de par son augmentation temporaire de la perfusion sanguine, principal véhicule de la plupart des agents mentionnés, à la tumeur. En plus de la radiothérapie, il pourrait être possible d'ajouter par exemple des agents chimiothérapeutiques ou immunostimulants se rendant à la tumeur pendant la thérapie préirradiation, ce qu'il ne serait pas possible de faire avec un traitement anti-vasculaire.

Avantages de la thérapie provasculaire ciblée

Comme décrit dans les catégories précédentes, le projet de thérapie provasculaire anticancer à l'aide de microbulles stimulées par ultrasons s'inscrit comme innovation par rapport à différentes techniques mises de l'avant. Il s'agit d'une technique peu invasive, spatialement spécifique et temporairement limitée, dont tous les composants sont approuvés cliniquement et pouvant s'inscrire en complémentarité avec plusieurs autres méthodes antitumorales. L'aspect ciblé de l'augmentation de la perfusion permet de contrer le principal désavantage des thérapies provasculaires classiques, soit l'effet du « vascular steal », où une vasodilatation systémique entraîne une réduction de la perfusion tumorale en redirigeant le sang aux vaisseaux normaux qui sont plus sensibles aux traitements vasculaires²⁴⁹. De plus, une augmentation de l'apport de sang aux tissus péri-tumoraux n'aurait de toute façon pas d'effet sur la radiosensibilité, comme ceux-ci ont un apport suffisant en oxygène.

Chapitre 5 – Article central

Présentation

L'article suivant est, au moment d'écrire ces lignes, en processus de révision interne. Nous planifions le soumettre à une édition spéciale du journal *Bionconjugate Chemistry* (Impact Factor 2020 = 4,774) : Sonotheranostics and Sonogenetics.

Pour le bien du processus de soumission, l'article est présenté en anglais. Cependant, les figures et citations sont intégrées au corpus du mémoire, de sorte qu'une liste de références unique se trouve à la fin du présent document, et non une bibliographie propre à l'article, et une deuxième indépendante, unique au mémoire.

Au sein de ce projet, Simon Michon a conçu et réalisé l'ensemble des expériences, l'analyse de données et la rédaction de l'article et du mémoire. François Yu, directeur de recherche, est à l'origine du concept; ses expertises se situent dans le domaine des ultrasons, des microbulles et de stratégies théranostiques (interface diagnostique/thérapeutique) dans le traitement du cancer. Francis Rodier est quant à lui co-directeur du projet, en plus de fournir une expertise en oncologie et en sénescence.

À noter : les numéros de figures présentées dans l'article débutent à 1 et continuent selon cette numérotation. Cependant, celles-ci se retrouvant intégrées dans le mémoire où d'autres figures étaient présentées dans les autres chapitres, une seconde légende avec la numérotation des figures du mémoire se trouve sous chaque figure de l'article, et utilise plutôt la numérotation 4.1, 4.2, 4.3, etc. La figure 4.1 du mémoire correspond bien à la figure 1 de l'article, la figure 4.2 à la figure 2 et ainsi de suite.

**Targeted Anti-Cancer Provascular Therapy using Ultrasound, Microbubbles and Nitrite to
Increase Radiotherapy Efficacy**

Simon MICHON^{1,2,3}, Francis RODIER^{1,3}, François T.H. YU^{1,2,3} *

¹ Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Canada;

² Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Canada

³ Département de Radiologie, Radio-oncologie et médecine nucléaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, Canada

** Correspondance:*

François T. H. Yu

francois.yu@umontreal.ca

Keywords: Radiotherapy, Cancer, Microbubbles, Ultrasound, Cavitation, Nitrite, Provascular therapy, Hypoxia

Article en processus de soumission à Bionconjugate Chemistry

Abstract

Hypoxia is an important mechanism of resistance to radiation therapy in many human malignancies including prostate cancer. It has been recently shown that ultrasound targeted microbubble cavitation (UTMC) can increase blood perfusion in skeletal muscle by triggering nitric oxide signaling. Interestingly, this effect was amplified with a sodium nitrite co-injection. Since sodium nitrite has been shown to synergize with radiotherapy (RT), we hypothesized that UTMC with a sodium nitrite co-injection could further radiosensitize solid tumors by increasing blood perfusion and thus reduce tumor hypoxia. We evaluated: (1) the ability of UTMC with and without nitrite to increase perfusion in muscle (mouse hindlimbs) and human prostate tumors using different pulse lengths and pressure; (2) the efficacy of this approach as a provascular therapy given directly before RT in the human prostate subcutaneous xenografts PC3 tumor model. Using long pulses with various pressures, in muscle, the provascular response following UTMC was strong (6.61 ± 4.41 fold increase in perfusion post-treatment). In tumors, long pulses caused an increase in perfusion (2.42 ± 1.38 folds) at lower mechanical index (MI = 0.25) but not at higher MI (0.375, 0.5 and 0.750) when compared to control (no UTMC). However, when combined with RT, UTMC with long pulses (MI=0.25) did not improve tumor growth inhibition. With short pulses, in muscle, the provascular response following UTMC (SONOS) + nitrite was strong (13.74 ± 8.60 fold increase in perfusion post-treatment). In tumors, UTMC (SONOS) + nitrite also caused a provascular response (1.94 ± 1.20 fold increase in perfusion post-treatment) that lasted for at least 10 minutes, but not with nitrite alone. Interestingly, the blunted provascular responses observed for long pulses at higher MI without nitrite was reversed with the addition of nitrite. UTMC (SONOS) with and without nitrite caused an increase in perfusion in tumors. The provascular response observed for UTMC (SONOS) + nitrite was confirmed by histology. Finally, there was an improved growth inhibition for the 8 Gy RT dose + nitrite + UTMC group vs. 8 Gy RT + nitrite alone. This effect was not significant with mice treated by UTMC + nitrite and receiving doses of 0 Gy or 2 Gy RT. In conclusion, UTMC + nitrite increased blood flow leading to an

increased efficacy of higher doses of RT in our tumor model, warranting further study of this strategy.

1. Introduction

Radiotherapy (RT) is used in mono- or combination-therapy in almost two-thirds of cancers in the Western world¹⁶⁷. Significant advances have been made in recent years by increasing the precision and personalization of treatments¹⁸⁸, but RT efficacy remains ultimately limited by off-target toxicity and intrinsic radio-resistance caused by several factors including hypoxia. In particular, prostate cancer, the most common cancer affecting men, is routinely treated with RT, but the efficacy of treatment remains limited by hypoxia in subsets of patients that will relapse^{250–252}. The main mechanism of action of RT is the formation of reactive oxygen species (ROS), which cause irreparable damage to DNA²²⁵, hence the effectiveness of RT drops drastically when the pO₂ at the target site is less than 10 mmHg^{186,187}. This often occurs in tumors because of the chaotic abnormal vascularization^{213,214}, which results in poor and unevenly distributed blood perfusion and oxygen distribution. Thus, reducing tumoral hypoxia could directly improve RT efficacy, minimize harmful long-term side effects and improve patient outcome^{169–171}.

Overcoming hypoxia is a major hurdle in oncology²¹³. Chemical therapeutic agents are not delivered as effectively in a less perfused hypoxic tumor microenvironment, as poorly perfused tumors do not efficiently distribute drugs to targeted cells²²⁶. Moreover, it has been well-established that hypoxia itself further drives resistance to treatment^{253,254}. Two types of hypoxias can be distinguished in the tumor setting. Chronic (or diffusion-limited) hypoxia is caused by poor vascularization and depleted oxygen transport and lasts for hours or days²⁵⁵. Many strategies have been tested to decrease chronic hypoxia²⁵⁶, such as hypoxia-activated prodrugs²²⁹, red blood cells and erythropoietin transfusion^{233,234}, gene therapy²³⁹ and oxygen transport agents^{243,245}, to name a few. However, a clinically applicable treatment has yet to be found, as abnormal tumor vessels are difficult to target. On the other hand, acute hypoxia is caused by local and momentary disturbances in perfusion, analogous to the phenomena of high and low tides²²⁰. Note that several

subtypes can further refine this classification²¹⁷. Recent literature suggests that it would be more important to target acute hypoxia rather than chronic hypoxia in the treatment of cancer, as acutely hypoxic cells have a greater metastatic potential than chronically hypoxic cells^{257,258}. Interestingly, increasing blood perfusion in tumors could address both types of hypoxias by increasing the overall oxygen supply and by reperfusing transiently underperfused acutely hypoxic areas. Provascular therapies, such as sodium nitrite²⁵⁹, sodium nitroprusside²⁶⁰ or nitroglycerin²⁶¹ administration, aim at momentarily increasing the supply of blood, therefore oxygen, to hypoxic tumors in order to subsequently improve the efficacy of RT. Unfortunately, these systemic approaches suffer from the “vascular steal effect” where the vasoactive response is stronger in “normal” vs. “impaired tumoral” vasculature and therefore results in no net improvement in tumoral perfusion^{262,263}, which stresses the importance for localized provascular therapy.

Microbubbles (MB) are echogenic gaseous structures measuring between 1 and 6 μm (the size of a red blood cell) that have been used for over 30 years as ultrasound (US) contrast agents for imaging³⁶. Interestingly, higher US intensities can cause sustained MB stable and/or inertial cavitation that can be harnessed for local and targeted therapeutic applications²⁶⁴. US targeted microbubble cavitation (UTMC) is thus an image-guided therapeutic platform that: (1) can target a tissue of interest with precision to induce local drug release or cause local therapeutic bioeffects; (2) reach deep tissue structures up to \sim ten centimeters; and (3) has a strong translational potential since US and MBs are already present in the clinical setting and have a long-standing track record of safety. For cancer therapy, MBs have been used as vectors to deliver various chemotherapy drugs^{85,86}, nucleic acids^{87,88} or immunostimulatory molecules^{90,92} to the tumor site. Interestingly, MBs have also been used for anti-vascular tumor treatments: since the tumor vascular network is often composed of poorly defined and fragile vessels⁹⁷, it was shown that UTMC at 500 kHz could induce apoptosis/necrosis in endothelial cells leading to ischemia and vascular shutdown^{100–102}. Studies demonstrated that the combination of anti-vascular UTMC therapy with RT inhibited tumor growth to a greater extent than RT alone. This effect has been shown in mouse and rabbit models bearing human prostate tumor xenografts (PC3 cells), where a significant decrease in vascular function was observed in tumors receiving the combined

treatment (UTMC + RT) compared to control and single treatment groups. This was associated with an increase in cell death, a decrease in vascular index (blood flow), and a decrease in oxygen saturation^{104,265}. A clinical study is currently underway²⁶⁶. However, while anti-vascular therapies seem promising, the occluded tumor vasculature prevents further access for chemotherapeutic agents or immunostimulants and often leads to a rebound via stimulated angiogenesis^{267,268}.

Herein, we propose a different paradigm for UTMC radiosensitization. Indeed, it was recently shown that UTMC can lead to a local increase in blood flow in muscle^{1,269}. This vasodilation was shown to be mediated by purinergic signaling and the activation of the eNOS pathway. There is evidence that the eNOS pathway is active in tumor tissues²⁷⁰. Furthermore, it was recently shown that UTMC combined with a sodium nitrite co-injection further increased the microvascular blood volume in muscle by 6-8 folds²⁵⁹. Since nitrite is a nitric oxide (NO) donor in hypoxic and acidic environments^{118,119} and can enhance endogenous NO production¹²⁰, we hypothesized that UTMC and nitrite could be synergistic as a spatially targeted provascular therapy in combination with RT in solid tumors. To our knowledge, this effect of increasing perfusion by UTMC has never been validated in the tumor, nor has it been combined with subsequent RT.

In this study, our objectives were: 1) to investigate the combination of UTMC and nitrite using long and short pulse US to induce a provascular response in mice muscle; 2) to verify if this response was also present in a solid tumors model of prostate cancer; 3) to test if the provascular response in tumors was sufficient to increase the efficacy of RT; 4) to confirm provascular responses histologically using pre- and post-treatment differential hypoxia markers.

2. Material and methods

2.1 Cell Culture conditions

Human prostatic adenocarcinoma cells (PC3 line, ATCC) were cultured as previously described²⁷¹. Briefly, cells were cultured using RPMI (350-000-CL, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) supplemented with 10% FBS (12483, Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 100

IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (450-201-EL, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), and maintained at 37 °C in humidified 20% O₂ and 5% CO₂ conditions.

2.2 Animal Model

PC3 cells were injected bilaterally (1×10⁶ per side) subcutaneously in immunodeficient male NOD-Rag mice (Stock 7799, NOD.Cg-Rag^{1tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, Jackson Lab). Provascular therapy treatment was performed when the tumor reached a target size of 350 mm³ (Fig. S3). All experiments were conducted under anesthesia with 2% isoflurane. All experiments were approved by the CHUM research center Institutional Animal Protection Committee and certified by the Canadian Council on Animal Care.

2.3 Ultrasound Contrast Agents

Microbubbles (Definity™, Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA) were continuously infused via a tail vein catheter (28G x ½" needle gauge) using a syringe pump at a flow rate of 2-5 µL/minute. The flow rate was adjusted by monitoring a non-treated area using real-time contrast enhanced US imaging, to maintain a constant systemic concentration of MBs during the experiment. The tail vein catheter was also used for the injection of sodium nitrite (4 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 minutes before UTMC treatment.

2.4 Ultrasound Perfusion Imaging and Therapy

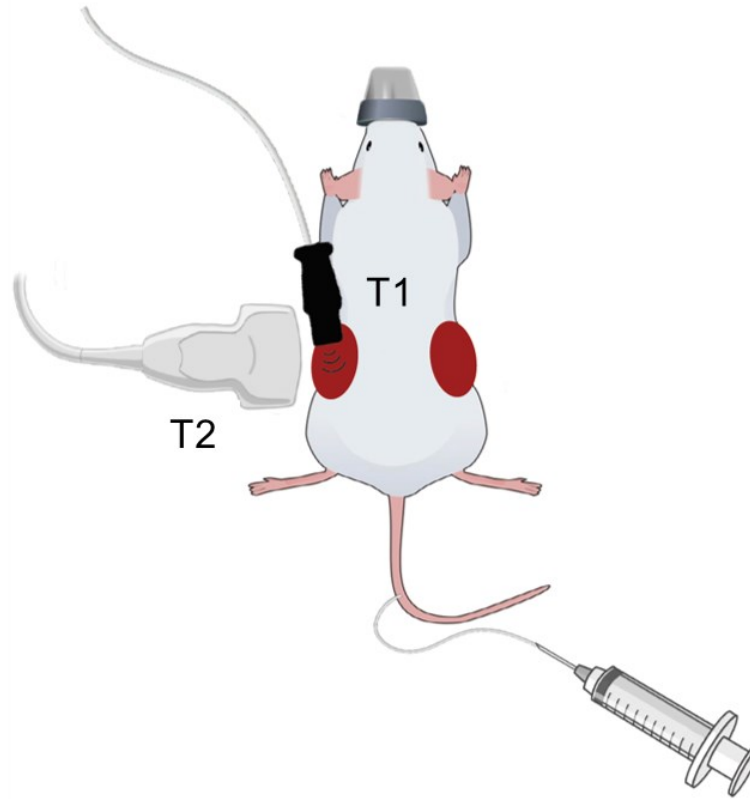
A 7 MHz central frequency ultrasonic imaging probe (15L8 probe, Sequoia, Siemens) was placed parallel to the surface on which the mouse was lying, allowing real-time tumor perfusion imaging and the recording of burst replenishment cine-loops to be processed offline (CPS7 mode; Imaging: mechanical index (MI) = 0.2, frame rate = 5 Hz; Burst: MI = 1.9, 5 frames). Two therapeutic transducers were used to compare the effect of the MI on vasodilation. A 1 MHz single element transducer (A303S, ½ inch, Olympus NDT, Waltham, MA; MI = 0.13-0.75), driven by a function generator (33511B Trueform Waveform Generator, Keysight, Santa Rosa, CA) and a power amplifier (75A250, Amplifier Research, Souderton, PA) or a 1.3 MHz probe (S3 probe, SONOS 5500, Philips) in ultraharmonic power Doppler mode (MI = 1.3, 1 frame) was positioned perpendicularly to the imaging plane, above the tumor and used for therapy (Fig. 1A). UTMC consisted of a total of 60 therapeutic pulses sent every 10 to 15 seconds. The time between pulses

was adjusted by live monitoring of MBs tumoral reperfusion and corresponded to the time it took for the MBs to fill the ultrasound treated area after a pulse. Different pressures of the therapeutic pulse were tested, varying between 125 and 750 kPa for the single element transducer and 1500 kPa for the SONOS probe. Pressure was calibrated using a membrane hydrophone (HMB-0200, ONDA corp.) in a degassed water tank using a motorized 3D positioning system. The SONOS probe was positioned to cover the tumor and the left peritumoral region for the first 30 pulses, and slightly repositioned to cover the tumor and the right peritumoral region for the last 30 pulses, in order to treat the largest tumor area possible.

2.5 Experimental Protocol for Burst Replenishment Imaging

Tumoral perfusion was quantified using burst replenishment imaging (BRI)²⁷². A baseline infusion value was taken before performing the treatment, in order to have a pre-treatment and post-treatment comparison. Following the 60 therapeutic pulses, BRI cineloops were recorded at different time points (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 minutes) after the end of the treatment to quantify the amplitude and duration of the provascular response, without moving the imaging probe for the entire experiment.

A.



B.

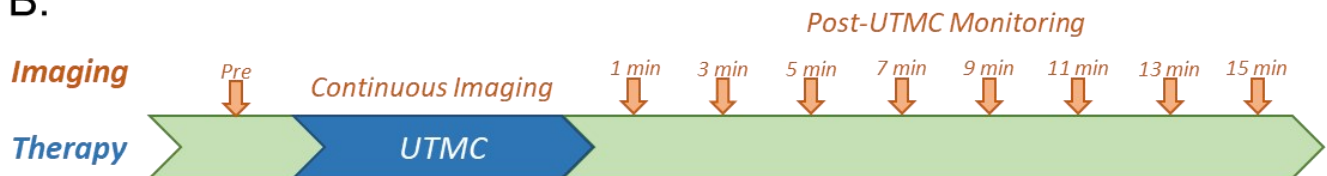


Figure 4.1 : Experimental setup and protocol for in vivo perfusion quantification using US contrast imaging and UTMC treatment. **A.** In vivo setup: Microbubbles are injected through the tail vein. Two transducers are used to treat (T1) and image (T2) the tumor. **B.** Experimental protocol: Burst reperfusion cineloops are taken before treatment and at different timepoints post-treatment to compare perfusion values. During UTMC, continuous contrast enhanced ultrasound imaging is used to ensure MB replenishment between therapeutic pulses and to adjust the therapeutic pulsing interval.

2.6 Histology

It has been shown that changes in hypoxia could be differentiated histologically²⁷³. Indeed, pimonidazole (nitroimidazole family) can be used to follow long term hypoxia, as it accumulates in hypoxic cells and has a long half-life^{274,275}. In contrast, short term levels of hypoxia can be measured through the expression of various endogenous proteins. For instance, HIF1 α is increased during hypoxia²⁷⁶ but it is quickly degraded in the presence of oxygen. Thus,

pimonidazole and HIF1 α were respectively used for the differential characterization of pre- and post-treatment hypoxic areas to calculate a reperfusion ratio (see details below).

Briefly, a 200 μ L bolus of pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe-1, Chemicon, Temecula, CA) dissolved in PBS was administered at 120 mg/kg via the tail vein 90 minutes before sacrifice. After sacrifice, tumors were collected and frozen in OCT mounting medium (Sakura Tissue-Tek, Torrance, CA). Consecutive 5 μ m sections were cut for each tumor. For pimonidazole and HIF1 α staining, sections were air-dried for 30 minutes and fixed in formaldehyde for 30 minutes. Sections were then briefly air-dried and rehydrated with cold PBS-t 2 times, 5 minutes each. Once rehydrated, slides were not allowed to dry out. Sections were then blocked (1% BSA + 0.1% Tween20 in PBS) for 30 minutes. Blocking solution was then poured off and mixture of primary antibodies was added (1:100 dilution of mouse monoclonal anti-pimonidazole [#HP Mab-1, Hypoxyprobe, Burlington, MA] and 1:100 dilution of rabbit polyclonal anti-HIF1 α [#NB100-479, Novus Biologicals, Toronto, ON, Canada]) and incubated 1h at room temperature. Slides were washed 3 times with PBS-t for 5 minutes each and incubated with mixture of secondary antibodies (1:500 dilution of goat polyclonal anti-rabbit Alexa Fluor 647-conjugated antibody [A-21422, Invitrogen, Waltham, MA] and 1:1000 dilution of goat polyclonal anti-mouse Alex Fluor 555-conjugated antibody [A-21244, Invitrogen, Waltham, MA]) for 1h at room temperature. Sections were then washed 3 times with PBS-t for 5 minutes and mounted with ProLong™ Gold Antifade with DAPI (ThermoFisher, Waltham, MA) and sealed.

All sections were scanned using a VS-110 microscope with a 20x 0.75 NA objective and a resolution of 0.3225 μ m (Olympus Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada) and analysed with Image J²⁷⁷. Each slide had three channels: 1) blue for DAPI dye (cell nuclei), used for scanner focusing, 2) yellow for pimonidazole (pre-treatment hypoxia) and 3) red for HIF1 α (post-treatment hypoxia). For each tumor, a control slide with only secondary antibodies was used to determine median background intensity for both pimonidazole and HIF1 α channels. The average median value for each marker was then calculated. HIF1 α and pimonidazole channels were then arbitrarily thresholded, keeping only pixel values between 1.33 and 3 times the average median background value to obtain the area positive for each marker while limiting border effects. A percentage of the pixels in the tumor region of interest (ROI) ranging between the determined

threshold was then obtained. This percentage was obtained in both markers' channels to reflect the positive area of each marker. A reperfusion ratio (pre-treatment hypoxia positive/post-treatment hypoxia positive) was finally calculated to quantify reperfusion (ratio > 1 indicates reperfusion).

2.7 Radiotherapy

Mice were randomly assigned to receive 0, 2 or 8 Gy following UTMC and nitrite therapy. The right tumor received UTMC while the left tumor served as a non UTMC-treated control. The mice received whole-body irradiation within 10-20 minutes (1 MHz single element transducer) and 9-11 minutes (1.3 MHz SONOS probe) after the end of UTMC treatment, which was within the UTMC mediated provascular response window (see Fig. S4). Tumor size evolution was followed for 25 days post-treatment using calipers, calculated as (length x width x thickness x 1/2).

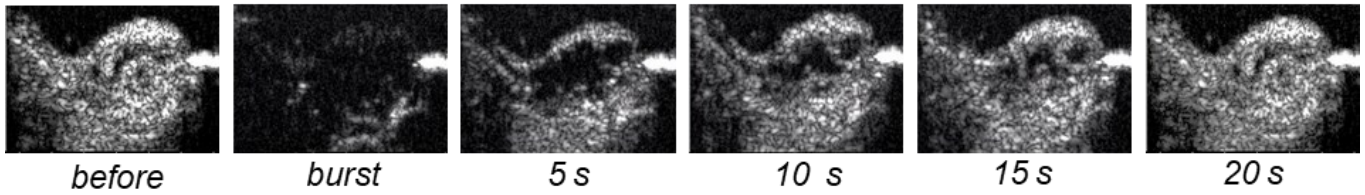
2.8 Burst Replenishment Imaging - Cine-loops Analysis

Subsequent analysis of US perfusion videos was performed offline using a custom MATLAB program (MATLAB, version 9.8.0 (R2020a), Natick, Massachusetts). The video intensity was fitted to an exponential curve:

$$y = A (1 - e^{-\beta t}) \quad 5.1$$

in which A (plateau video intensity) corresponds to the blood volume [dB] and β ($1/\tau$: Rate constant) corresponds to the time for the video intensity to reach 63% of the plateau video intensity [s^{-1}] ²⁷² (see Fig 2B). $A \times \beta$ [dB/s] is a measure of the perfusion flow rate. For the tumor videos, two regions of interest were manually delimited: the Perfused and Hypoxic ROIs were determined in the pre-treatment video based respectively on the presence or absence of MBs 10-15 seconds after the imaging burst (Fig. 2). This time interval corresponded to the time between therapeutic pulses in the subsequent treatment, to represent ROIs where MBs were affected by the therapeutic pulses.

A.



B.

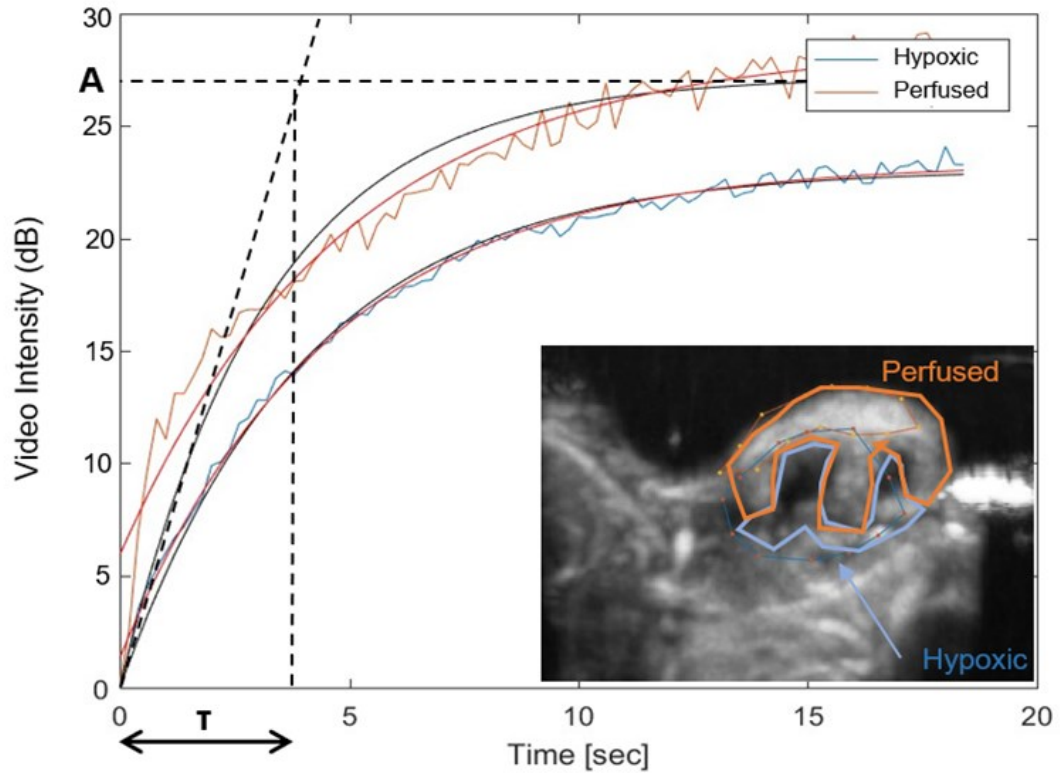


Figure 4.2 : Burst Replenishment Imaging. **A.** Typical real-time burst replenishment imaging cinelooop of MB flowing through the tumor, in which a burst (5 frames, MI =1.9) was sent by the imaging probe (15L8 probe, 7MHz CPS mode, Sequoia 512, Siemens) at $t = 0s$ to break the MB in the image; **B.** MB replenishment was quantified offline to derive blood volume (A) and MB perfusion ($A \times \beta$) by fitting video intensity with an exponential function [$y = A (1 - e^{-\beta t})$], where A is the plateau video intensity [dB] (maximum MB concentration) and β is the rate constant [s^{-1}]. Perfused and hypoxic ROIs were determined in the pre-treatment cinelooop as the regions respectively perfused and not perfused by microbubbles in the treated area.

2.9 Statistics

The kinetics of the provascular response was quantified by measuring $A \times \beta$ pre-treatment and at different time points post-treatment. The steady state post-treatment perfusion values were averaged and normalized by the pre-treatment value to compute the relative change in perfusion for each tumor (1 = no change; <1 = decrease; >1 = increase). The effect of the treatments on the change in perfusion were tested using one-way (Fig. 3C, 4B, 4C) or two-way ANOVAs (Fig. 5), followed when appropriate by post-hoc Tukey's HSD or Fisher's LSD tests, as indicated, to compare differences between treatment groups. To compare if the post-treatment perfusion values of tumors within a group were significantly different from their pre-treatment values, a paired Student t-test was performed between the pre-treatment and post-treatment perfusion values (Fig. 3B, 4D). A Mixed-Model Analysis was used to compare the effect of UTMC treatment on RT (Fig. 7), followed by post-hoc Sidak test. All tests were performed using Prism 8.4.1 (GraphPad software, LaJolla, CA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 UTMC increases perfusion in muscle

We first tested if a provascular response could be obtained in mice muscle, similarly to what was observed in rats, using long tone bursts at 1 MHz¹. A typical burst replenishment cineloop is represented in Fig. 3A, where it can be visually appreciated that MBs replenish the treated area faster post UTMC therapy. Several US parameters were tested with the 1 MHz transducer in the muscle of mice (variation in pressure 250-750 kPa, number of cycles 10-5000 cycles, number of pulses 60-120), and all regimen caused an increase in perfusion (Fig. 3B): we observed an average 6.61 ± 4.41 -fold increase in the relative change in perfusion post-treatment (***) = $p < 0.001$, paired t-test), regardless of the parameters used. To increase the pressure level (750 kPa was the highest pressure we could obtain at 1 MHz), we then used a clinical system (SONOS) at 1.3 MHz and a mechanical index of 1.3 in ultraharmonic power Doppler, as described in Belcik et al. (2017)²⁶⁹. Following UTMC, perfusion increased by 3.07 ± 1.47 folds (* = $p < 0.05$, paired t-test, Fig. S1A). With the addition of sodium nitrite, there was a spectacular 13.74 ± 8.60 relative change in perfusion with SONOS (***) = $p < 0.001$, paired t-test, Fig. S1C), whereas sodium

nitrite without UTMC caused no change in perfusion (0.93 ± 0.17 relative change in perfusion, $p=0.63$, paired t-test, Fig. S1B). The differences in perfusion with respect to nitrite were significant for SONOS alone and SONOS + nitrite (respectively $* = p<0.05$, $** = p<0.01$, Fisher's LSD post-hoc) (Fig. 3C).

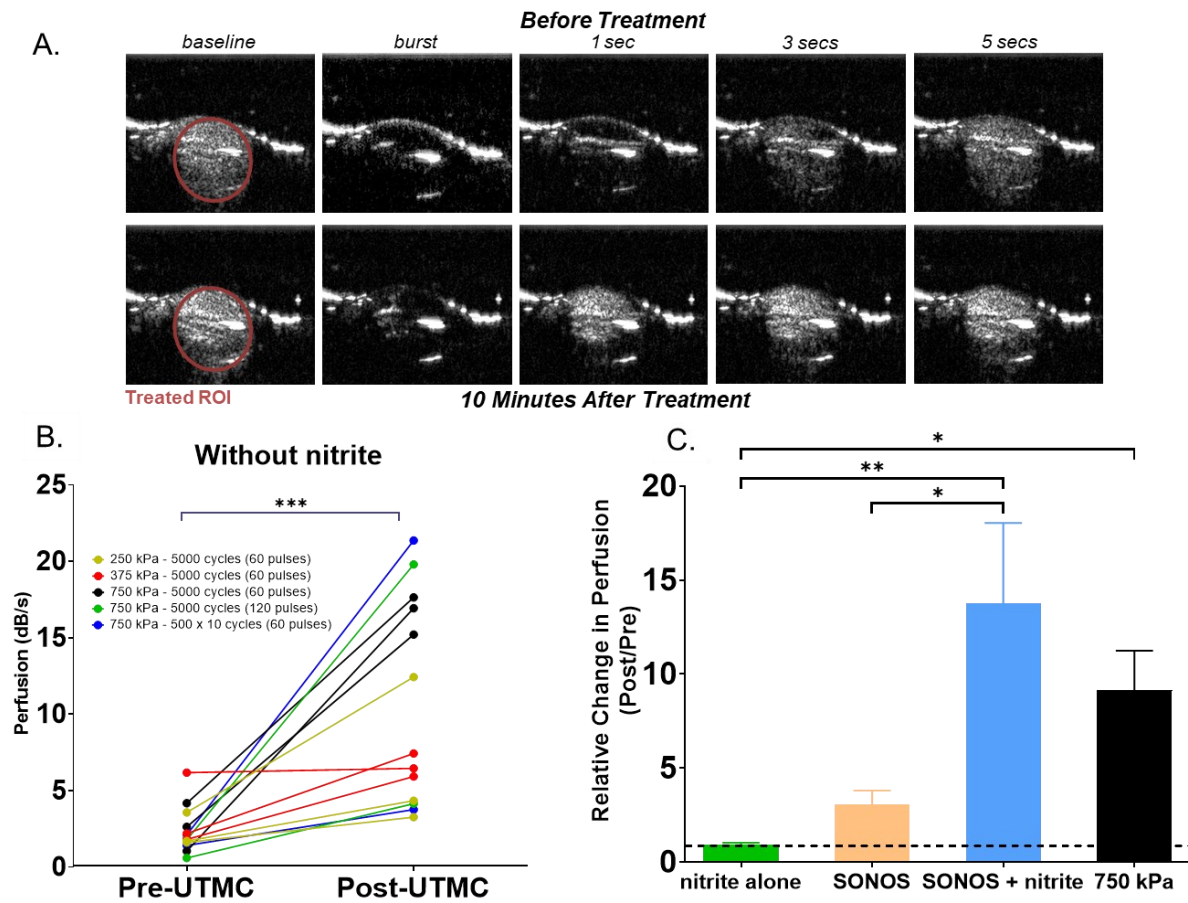


Figure 4.3 : UTMC mediated provascular response in the hindlimb muscle. **A.** Burst replenishment cineloops taken before (upper row) and 10 minutes after the end of UTMC therapy (1 MHz, 375 kPa, 500 x 10 cycles, 60 pulses); **B.** Pre- and post-treatment perfusion values in the hindlimb muscle following UTMC without nitrite: for all tested US pulses, UTMC caused an increase in perfusion (average 6.61 ± 4.41 folds [*** = $p<0.001$, paired Student t-test]); **C.** Relative change in perfusion following UTMC: UTMC (SONOS) + nitrite dramatically improved perfusion in muscle (13.74 ± 8.60 folds) ($n=4$), significantly higher than nitrite alone ($n=3$) and SONOS alone ($n=4$) ($* = p<0.05$, $** = p<0.01$, Fisher's LSD post-hoc). The best treatment condition for long pulses is shown for comparison (750 kPa, 60 and 120 pulses merged, $n=5$).

3.2 Provascular response to UTMC as a function of pressure in tumor with the 1 MHz transducer

We first investigated the effect of varying the pressure (125 – 750 kPa) using long tone burst US at 1 MHz. In the Perfused ROI of tumors, the perfusion increased in 43 of 56 tumors. Pressure affected the relative change in perfusion ($p=0.0002$, ANOVA). Fisher's LSD post-hoc analysis revealed that perfusion increased for UTMC at 250 kPa (2.42 ± 1.38 fold change in perfusion, $*** = p<0.001$, $n = 18$) when compared to the control group (1.05 ± 0.22 fold change in perfusion, $p = 0.78$, $n = 8$) but not for UTMC at higher pressure put together (375, 500, 750 kPa; 1.31 ± 0.60 fold change in perfusion, $p = 0.277$, $n = 31$) (Fig. 4B). This increase was also significant when compared to tumors treated at 375 kPa (1.39 ± 0.65 fold change in perfusion, $*** = p<0.001$, $n = 14$), 500 kPa (1.49 ± 0.66 fold change in perfusion, $** = p<0.01$, $n = 9$), and at 750 kPa (0.96 ± 0.30 fold change in perfusion, $*** = p<0.001$, $n = 8$). In tumors subjected to low pressure (125 and 250 kPa), post-treatment perfusion values were significantly higher than their pre-treatment values ($*** = p<0.001$, paired t-test, Fig. S2A). There was no significant difference in tumors subject to high pressure (375, 500, 750 kPa) between their pre-treatment perfusion values and their post-treatment counterparts.

In the Hypoxic ROI of tumors, perfusion increased in 35 of 56 tumors. Similarly, pressure affected the relative change in perfusion ($p=0.02$, ANOVA). Fisher's post-hoc LSD analysis revealed that perfusion increased for UTMC at 250 kPa (2.24 ± 1.40 fold change in perfusion, $* = p<0.05$, $n = 18$) when compared to the control group (1.10 ± 0.26 fold change in perfusion, $p = 0.603$, $n = 8$), but not for UTMC at higher pressure put together (375, 500, 750 kPa; 1.20 ± 1.39 fold change in perfusion, $p = 0.09$, $n = 31$) (Fig. 4C). This increase was also significant when compared to tumors treated at 500 kPa (0.82 ± 0.50 fold change in perfusion, $** = p<0.01$, $n = 9$), and at 750 kPa (0.70 ± 0.87 fold change in perfusion, $** = p<0.01$, $n = 8$). In tumors subjected to low pressure (125 and 250 kPa), post-treatment perfusion values were significantly higher than their pre-treatment values ($** = p<0.01$, paired t-test, Fig. S2B). There was no significant difference in tumors subject to high pressure (375, 500, 750 kPa) between their pre-treatment perfusion values and their post-treatment counterparts.

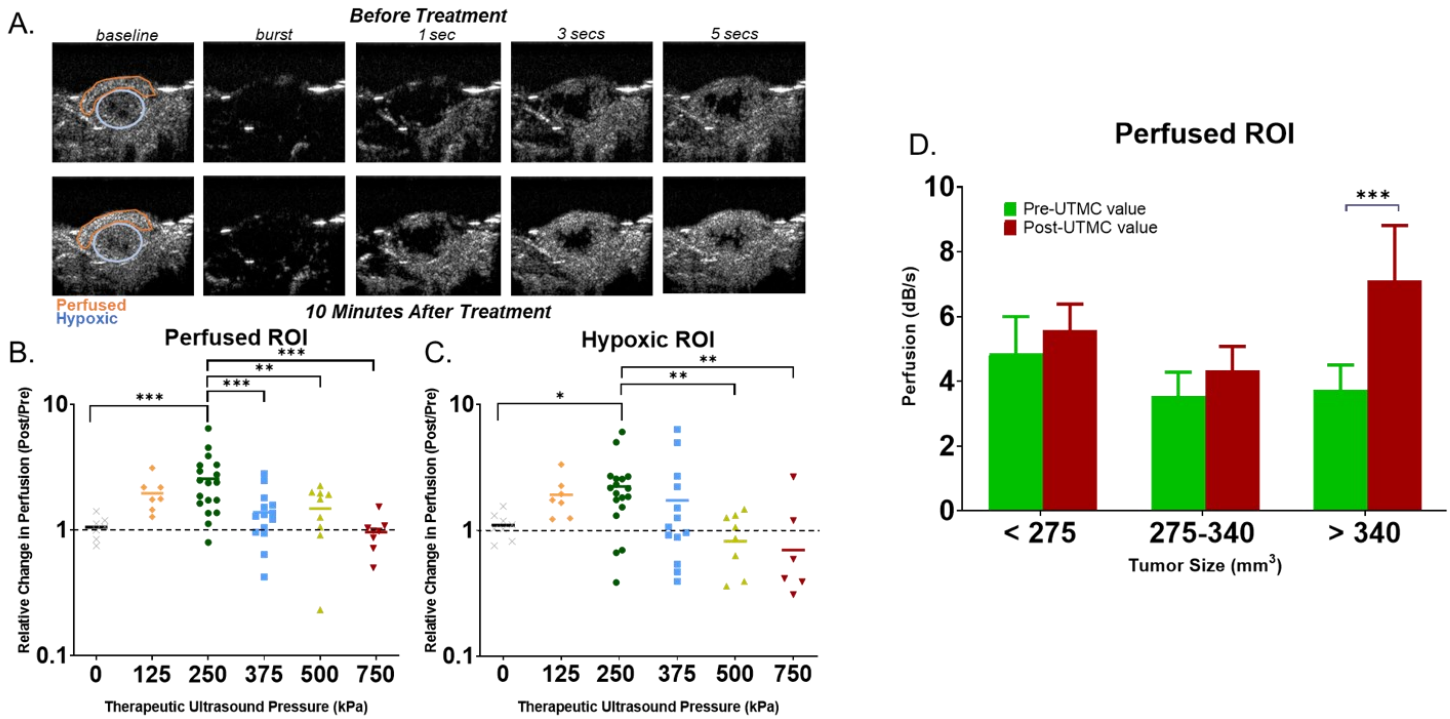


Figure 4.4 : Provascular response in PC3 tumors. A. Tumor perfusion pre- and post-UTMC therapy (1MHz, 250 kPa, 5000 cycles, 60 pulses). **B.** Pressure affected the relative change in perfusion (one-way ANOVA, $p=0.0002$): the relative change in perfusion in the perfused ROI as a function of US pressure (5000 cycles pulse length) (** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$, Fisher post-hoc). **C.** Relative change in perfusion in the hypoxic ROI as a function of US pressure (5000 cycles pulse length) (one-way ANOVA, $p=0.02$) (* = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, Fisher post-hoc). **D.** Perfusion in the perfused ROI as a function of tumor size. Post-treatment perfusion in big tumors (over 340 mm³, $n=28$) was significantly higher than pre-treatment value (*** = $p<0.001$, paired t-test).

In the Perfused ROI, with all the pulses put together and segregated by size into three groups (small, [under 275 mm³, $n=18$], medium [between 275 and 340 mm³, $n=19$], and big tumors [over 340 mm³, $n=19$]), the big tumors' post-treatment perfusion values were significantly higher than their pre-treatment values (*** = $p<0.001$, paired t-test, Fig. 4D). There was no significant difference in medium and small size tumors between their pre-treatment perfusion values and their post-treatment counterparts. This effect of size was not observed in the Hypoxic ROI of tumors.

3.3 Provascular response to UTMC in tumors with a clinical scanner, with and without nitrite

Since the provascular response in tumor decreased with pressure for long pulses, we investigated the use of short high-pressure pulses delivered by a clinical machine and tested if a nitrite co-injection would affect the provascular response.

In the Perfused ROI, there was a significant effect of time (***) = $p < 0.001$) and treatment (** = $p = 0.002$) on perfusion as measured by two-way ANOVA. There was a 2.08 ± 1.12 fold change in perfusion in tumors treated with SONOS alone, which was higher than for the control nitrite group (**** = $p < 0.0001$, Tukey post-hoc). There was also a similar significant provascular response for UTMC + nitrite with either 1.3 MHz SONOS transducer (**** = $p < 0.0001$, Tukey post-hoc) or 1 MHz transducer at 750 kPa + nitrite (**** = $p < 0.0001$, Tukey post-hoc) when compared to the nitrite alone group. This increase in perfusion was not seen with 750 kPa alone. The significant increase in perfusion lasted for at least 10-12 minutes for SONOS alone, SONOS + nitrite and 750 kPa + nitrite, as validated with Tukey post-hoc testing (Fig. 5).

Nitrite Perfusion Kinetics - Perfused ROI

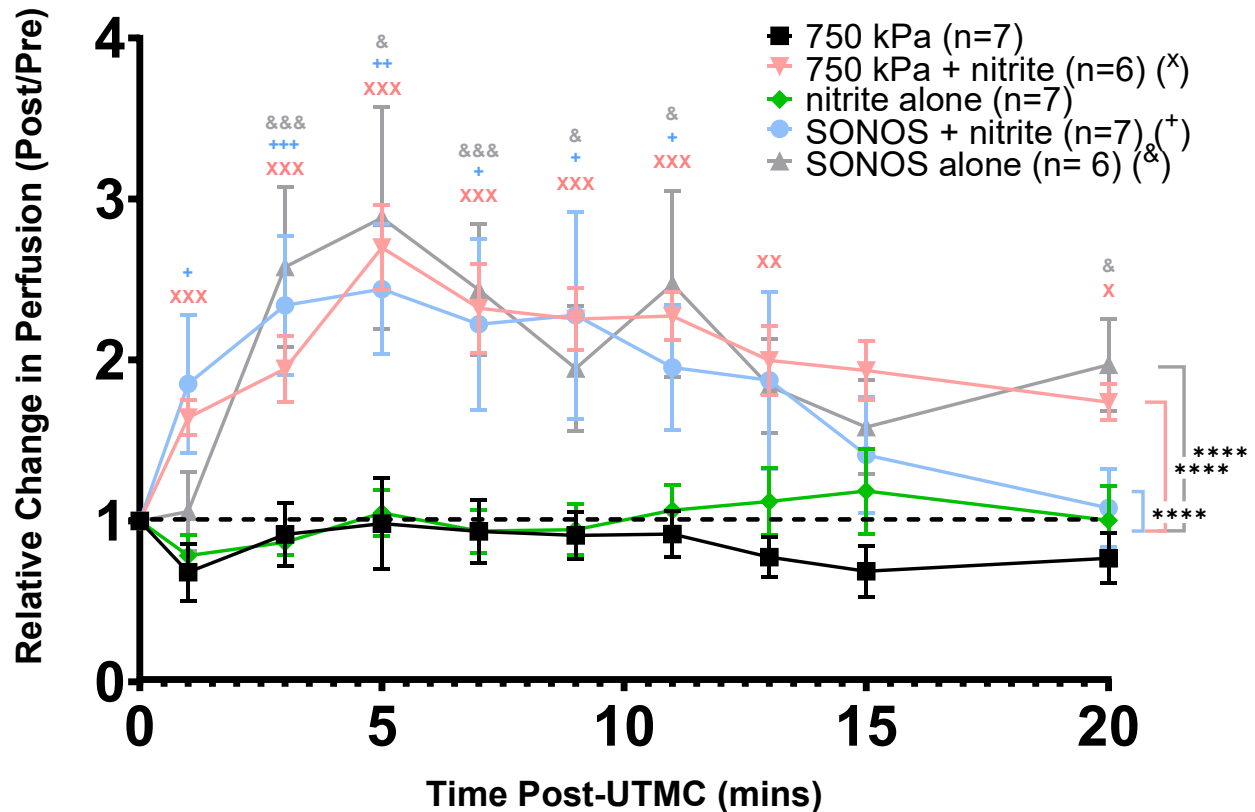


Figure 4.5 : Effect of UTMC + nitrite on tumor perfusion kinetics. Time (***) = $p < 0.001$) and treatment (** = $p < 0.02$) affected perfusion (two-way ANOVA). The provascular response for SONOS, SONOS + nitrite and 750 kPa + nitrite was higher than nitrite alone (**** = $p < 0.0001$, Tukey post-hoc). Significant increase vs nitrite at each timepoint is indicated (*, +, & = $p < 0.05$ respectively when compared to nitrite alone, Tukey post-hoc). Interestingly, the addition of nitrite induced a provascular response with the 750 kPa pulse that was not observed without nitrite.

3.4 Histology

In addition to the analysis of US videos, the increase in tumor perfusion was quantified histologically. The decrease in hypoxia in the treated tumor was measured as the ratio between pre-treatment and post-treatment hypoxia markers (Fig. 6A), giving a histological reperfusion ratio for each tumor.

Treatment affected the reperfusion ratio ($p = 0.03$, one-way ANOVA). Tumors receiving only nitrite had an average reperfusion ratio of 0.92 ± 0.10 ($n=4$), whereas those treated with

SONOS + nitrite showed a 1.33 ± 0.26 ratio (n=5), which was significantly different than the nitrite alone group (* = $p < 0.05$, Tukey post-hoc). The SONOS alone group (n=4) had a reperfusion ratio of 1.33 ± 0.25 , which was not significantly different than the nitrite alone group ($p = 0.06$, Tukey post-hoc) (Fig. 6B).

The reperfusion ratios for each tumor were then plotted against the individual relative change in perfusion following treatment and obtained by analysis of the US cineloops, for the perfused ROI (Fig. 6C) and the hypoxic ROI (Fig. 6D) of tumors. In both the hypoxic ($p = 0.0004$) and perfused ROI ($p = 0.0012$), the reperfusion ratio increased with the relative change in perfusion. Group analysis showed that for the SONOS + nitrite group, the reperfusion ratio increased with the relative change in perfusion in the hypoxic ROI ($p = 0.024$) and numerically in the perfused ROI ($p = 0.198$) (Fig. S6). This trend was also visible in the SONOS alone group, where the reperfusion ratio also increased with the relative change in both the hypoxic ($p = 0.491$) and the perfused ($p = 0.182$) ROI. There were no visible trends between the reperfusion ratio and the relative change in perfusion in the nitrite alone group (Fig S6).

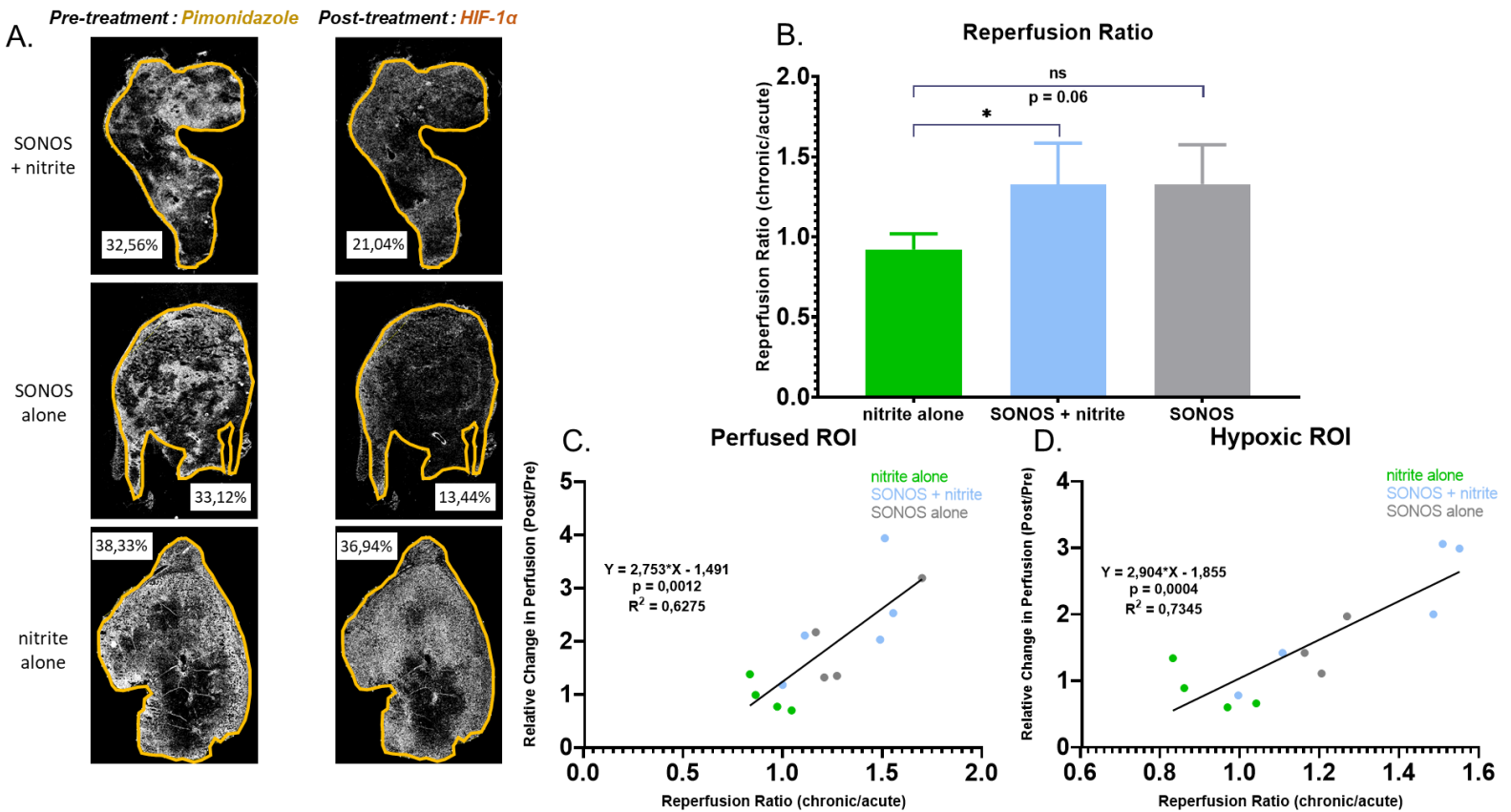


Figure 4.6 : Histological analysis of tumor hypoxia after UTM therapy. **A.** % hypoxic pixels pre-treatment (pimonidazole marker) and post-treatment (HIF-1 α) in dual stained sections. **B.** Histological reperfusion ratios for tumors receiving only nitrite (n=4), SONOS + nitrite (n=5) and SONOS alone (n=4) therapies; Treatment affected the histological reperfusion ratio (* = $p < 0.05$, one-way ANOVA). There was a significant difference between SONOS + nitrite and nitrite alone (* = $p < 0.05$, Tukey post-hoc). **C and D.** Correlation between histological reperfusion ratio and US relative change in perfusion in (C) tumor Perfused ROI and (D) in tumor Hypoxic ROI. One outlier was identified by the statistical software in the SONOS alone group (Reperfusion ratio of 2.46) in Figs. 6B, C and D and another one in the same group (Relative Change in Perfusion of 10.78) in Fig. 6D and were discarded.

3.5 Radiotherapy

A first RT cohort was subjected to UTM treatment with the 1 MHz transducer at 250 kPa (MI = 0.25). Tumors averaged $311.61 \pm 129.38 \text{ mm}^3$ at the time of treatment, and there was no difference in size between treated and untreated tumors for any treatment group (Fig. S3A). Tumors responded to RT in a dose dependent manner, as expected (Fig. 7A). However, no

difference could be observed for the transducer at 1 MHz and 250 kPa between tumors treated with and without UTMC.

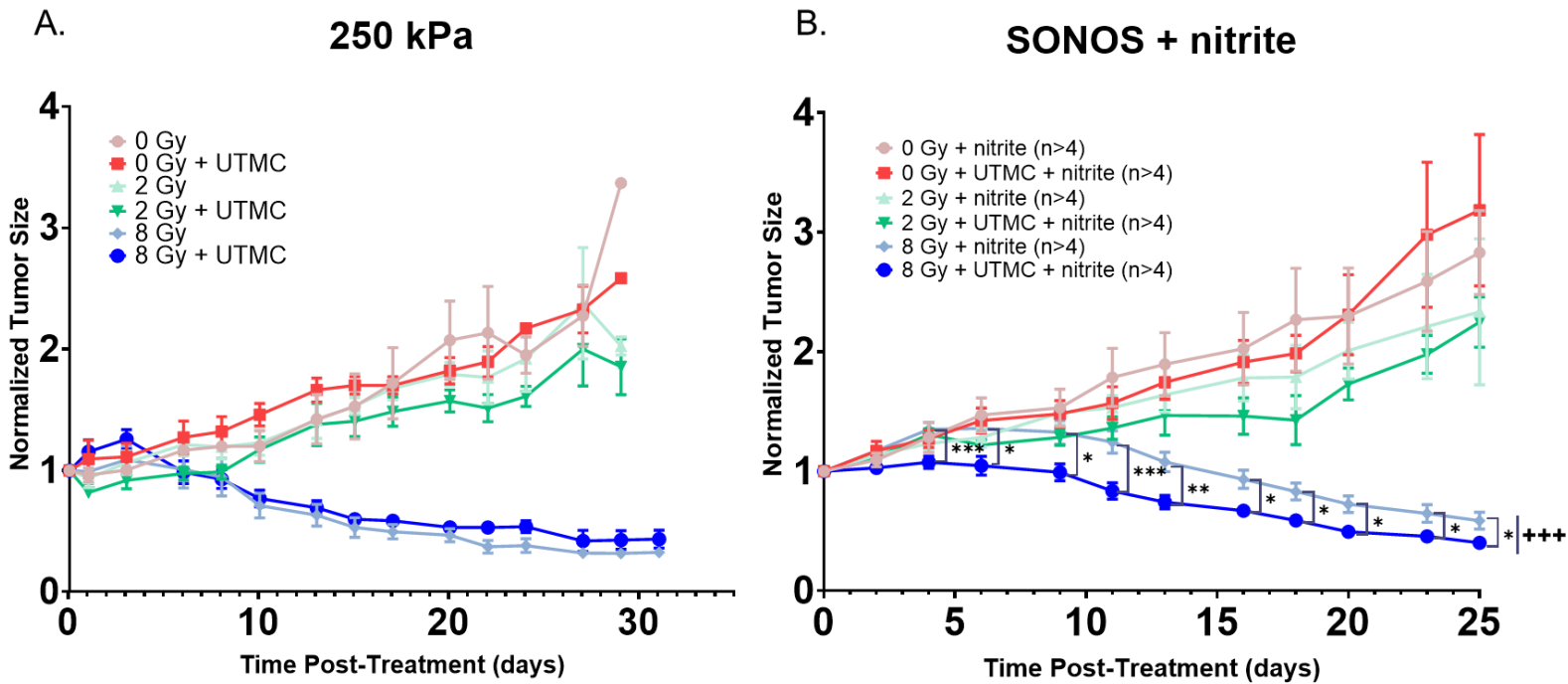


Figure 4.7 : Effect of UTMC on Radiotherapy Efficacy. Bilateral tumor sizes were measured for 30 and 25 days after UTMC+RT. Mice were irradiated 10 minutes after UTMC, during the UTMC mediated provascular response window (see Fig. S4). A. UTMC Treatment with long pulses (1 MHz, 250 kPa, 5000 cycles, 60 pulses) and B. UTMC Treatment with short pulses SONOS + nitrite. There was a significant difference in tumor sizes between the 8 Gy group (no-treatment) and the 8 Gy + UTMC + nitrite group (+++ = $p < 0.001$, Mixed-Model Analysis; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, Sidak post-hoc).

A second RT cohort was subjected to UTMC treatment with the 1.3 MHz transducer (SONOS) at 1500 kPa (MI = 1.3) with a co-injection of nitrite. Tumors averaged 360.69 ± 143.96 mm³ at the time of treatment, and there was no difference in size between treated and untreated tumors for any treatment group (Fig. S3B). Tumors again responded to RT in a dose dependent manner, as expected (Fig. 7B). This time, for the 8 Gy group, we observed a significant reduction in tumor growth for the UTMC group (+++ = $p < 0.001$, Mixed-Model Analysis). The difference between the two groups was significant from the 4th day post-RT day and remained significant for

at least 20 days ($p < 0.05$, Sidak post-hoc). No significant effect could be established for the 2 Gy group, although the tumors were numerically smaller with the combination therapy.

4. Discussion

Using systemic administrations, provascular therapies have been shown to synergize with RT in preclinical models^{256,270}, indicating that the vasodilation pathway is partly active in part of the tumoral and peritumoral vasculature^{278–280}. Interestingly, UTMC has recently been shown to result in targeted and localized vasodilation in muscle tissue^{1,281}. This increase in perfusion has been shown to be mediated by purinergic signaling and the release of NO by eNOS activation²⁶⁹. In the present study, we built on this work by demonstrating the translational potential of UTMC provascular treatment in the tumor and tested the hypothesis that a UTMC mediated provascular response in tumors could lead to an increase in the efficacy of RT.

4.1 Comparison of single element and SONOS in muscle

We first sought to validate in a mouse model the increased perfusion in muscle demonstrated in rodents in a few reference studies^{1,269}. The marked and sustained increase in perfusion in the hindlimb muscle following UTMC treatment with long pulses (1 MHz transducer) and short pulses (SONOS clinical scanner at 1.3 MHz), with or without concomitant nitrite injection, were in agreement with the values found in the literature for these same experiments in the rat^{1,123}. Note that nitrite alone did not increase perfusion (Figs. 3 and 6), consistently with other reports¹¹⁹. The single element configuration allowed testing long pulse length while the clinical scanner allowed: 1) to access higher pressures (up to 1500 kPa); 2) to treat a larger portion of the tumor; 3) to potentially allow an easier clinical translation.

4.2 UTMC provascular response in tumors with long pulses

We then tested if UTMC could generate a provascular response in tumors and investigated the time course of the response. With the 1 MHz transducer, lower pressure pulses (250 kPa) caused a two-fold increase in perfusion, which lasted for over 20 minutes (Fig. 4B, 4C, S4). This was a sufficient time window for RT. On the contrary, higher-pressure pulses (375, 500 and 750

kPa), caused a vasoconstriction effect. This spasmic response was also observed in muscle with higher pressure (1500 kPa)¹ but only lasted a few minutes, whereas it seemed to be maintained in tumors. These differences could be explained by a more chaotic and less functional tumor vascularization compared to muscle^{97,282}. Our data is suggesting that this more fragile tumor vascularization responds to higher pressure UTMC stimulation by causing a vasospasm, similarly to the findings of others in the context of anti-vascular therapies^{100–102}. The provascular response was more marked in the periphery of the treated region (Perfused ROI) than in the central region (Hypoxic ROI) with a greater proportion of tumors responding in the Perfused ROI than in the Hypoxic ROI (see Fig. 4B and 4C). This could be explained by the fact that the tumor peripheral vascularization is more similar in function and structure to the vessels of the surrounding tissue, while the hypoxic or even necrotic center may show a weaker response to vasoactive factors^{283–286}. The provascular response was also dependent on tumor size (and vessel maturation), with stronger responses in tumors larger than 340 mm³ (Fig. 4D). The more mature tumor vascularization of larger tumors would be consistent with this observation^{287–289}.

4.3 UTMC provascular response in tumors with SONOS and nitrite

For the 1.3 MHz transducer (SONOS), the perfusion and kinetics values following UTMC treatment were similar (~2.5 fold increase) to the values obtained at 250 kPa with the 1 MHz transducer (see Fig. 4B, 5 and S4). Histological validation (Fig. 6) corroborated the decrease in hypoxia following the SONOS + nitrite treatment. US and histological measurements of hypoxia were correlated (hypoxic ROI: $R^2 = 0.7345$, $p = 0.0004$; perfused ROI: $R^2 = 0.6275$, $p = 0.0012$), which supports the robustness of our findings. Interestingly, when each group was analysed individually, a significant correlation was found for SONOS + nitrite in the hypoxic ROI, but not with SONOS alone (Fig. S6), suggesting that the combination of SONOS + nitrite could be more efficacious than SONOS alone.

A sodium nitrite co-injection (SONOS + nitrite) resulted in an increase in perfusion compared to the control group (nitrite alone) (Fig. 5) but did not further increase the provascular response found with UTMC alone, as was the case in muscle (Fig 3C). The reason explaining this difference remains to be elucidated. It is possible that nitrite, which is known to be an endogenous NO donor¹²³ and an endogenous NO production enhancer¹²⁰ is unable to further increase NO

beyond a plateau in endogenous NO production in tumoral endothelial cells after UTMC stimulation. It is also possible that tumor vessels treated with UTMC are already close to maximal dilation, in which case adding vasodilating agents could have little or no effect on the blood flow²⁹⁰: this effect could be a consequence of the high levels of adenosine in tumor microenvironment, which is known to be a prominent vasodilator^{291,292}. This could explain the increase in perfusion observed in tumors treated at 750 kPa (1 MHz) + nitrite to a plateau of endogenous NO production or to a maximum dilation, and why there is no difference between the perfusion values of tumors treated with SONOS alone and those treated with SONOS + nitrite (Fig. 6). However, it is interesting to note that adding nitrite to the 750 kPa (1 MHz) therapy reversed the spasmic response observed at 750 kPa (Fig. 5). This effect of nitrite in spasm elimination was also noted in Yu et al.¹²³.

4.4 Synergy with radiotherapy

Finally, we investigated if UTMC provascular therapy could increase the efficacy of subsequent RT. For the first cohort subjected to UTMC with the single element (1MHz/250kPa), no difference was observed between the groups treated and not treated with UTMC, with either RT doses (Fig. 7A). However, in the second RT cohort (Fig. 7B), treated with nitrite +/- UTMC (SONOS), we observed a significant decrease in tumor size from the 4th day post-UTMC for tumors subjected to 8 Gy in combination with UTMC. Two reasons could explain these results.

First, the region treated with UTMC by the SONOS device is much larger than the region sonicated by the single element transducer (Fig. S5). In this sense, a much larger area was treated with UTMC treatment and thus lead to more extensive vasodilation and therefore more oxygen supply to the tumor. Second, although nitrite does not appear to have a significant effect on tumor vessels, it is possible that a larger treated area, in the presence of nitrite, could impact the afferent peritumoral vascularization, leading to an increase in NO and therefore vasodilation of the vessels supplying the tumor. This was particularly true as the SONOS probe was moved halfway through treatment thus further increasing the affected peritumoral vasculature. Although not statistically significant, tumors receiving 2 Gy and UTMC therapy were numerically smaller in size, which is encouraging. This is suggesting that the degree of reperfusion attained with our current UTMC therapy may be insufficient for a 2 Gy radiation regimen. Since the

radiation dose is smaller, only cells with a high baseline oxygen concentration will create sufficient ROS and thus be affected by the radiation. Tumors subjected to 8 Gy irradiation have a greater dose of radiation reaching the cells, which is potentially sufficient to cause the formation of ROS in hypoxic cells reperfused by provascular therapy.

Although a previously described study demonstrated the synergistic effect of anti-vascular UTMC treatment and RT doses of 2 Gy and 8 Gy when compared with tumors not treated with UTMC¹⁰⁴, provascular therapy keeps tumor and peritumoral vessels perfused. In addition to keeping alive healthy cells close to the perfused tumor, which limits damage to healthy surrounding tissues, the tumor vasculature could be used to transport synergistic anti-tumor agents, such as chemotherapeutic agents or immunostimulants. In addition, it should be noted that cavitation near the endothelial cells causes temporary permeabilization of the vessels⁵⁴, which can be used to improve the delivery of therapeutic molecules to the tumor site^{79,80,83,88,293}, which could not be possible with anti-vascular therapy. To our knowledge, this is the first demonstration that UTMC + nitrite can improve RT.

4.5 Provascular responses and histological reperfused areas

The increase in perfusion following treatment and detected by BRI was mainly important in the perfused periphery (Fig. 4B and 4C). These are the vessels that bring blood to the more hypoxic central regions. By increasing the perfusion in the periphery, we ensure a greater supply of blood downstream, and therefore more oxygen, which is crucial for RT. Histological analysis showed a relationship between the decrease in hypoxia after treatment and the increase in perfusion, mainly in the hypoxic center (Fig. 6D). We can therefore conceive a relationship between the marked increase in perfusion in the perfused periphery, which will increase the oxygen supply throughout the tumor but noticeably at the previously hypoxic center, which will result in an increase in the efficacy of high-dose RT which failed to reach these very hypoxic cells.

4.6 Limitations

There are a few limitations that can be pointed out in this study. First, we did not test the efficacy of SONOS without nitrite, nor the effect of 750 kPa with nitrite in combination with RT. While all these possibilities for optimization and mechanistic insights are exciting, we rather

focused our efforts at identifying the potential for synergy between RT and UTMC in this manuscript. Indeed, based on the strong provascular response of SONOS + nitrite in muscle and by the known synergy of nitrite with RT¹¹⁹, we chose a design in which we wanted to demonstrate the additive effect of UTMC on RT + nitrite. The necessity of combining nitrite with SONOS therefore remains to be tested but our data clearly supports that in the presence of nitrite, SONOS improves the response to RT.

Another, the effectiveness of the UTMC treatment is measured only by the increase in flow characterized by the concentration and return speed of MBs according to the BRI technique. In order to have a more direct measure of the proposed cascade leading to the increase in RT efficacy, it might be relevant to measure the tumor O₂ concentration before and after UTMC treatment. In addition, it is difficult to differentiate whether nitrite has a synergistic effect on UTMC treatment at 1.3 MHz, or whether only the higher MI is responsible for the effect observed at 8 Gy. In this sense, the NO concentration at tumor site before and after UTMC treatment could be an interesting addition to the study.

Finally, several recent studies seem to uphold the value of fractioned-dose in RT to achieve an optimal effect on tumor tissue while leaving healthy cells the opportunity to recover after irradiation at lower intensity than the equivalent single dose^{294–296}. It could therefore be interesting to assess whether several UTMC treatments spaced out over time combined with a fractioned-dose irradiation regimen would make it possible to potentiate the synergy between UTMC and RT.

5. Conclusions and clinical impact

In conclusion, UTMC treatment appears to be effective in increasing perfusion in tumors with long US pulses, either with lower pressure pulses (250 kPa) and in bigger tumors (>340 mm³), or by adding nitrite to reverse the spasmic response at higher pressure. Alternatively, short high-pressure pulses delivered using a clinical scanner (SONOS) can also induce a provascular response, which in combination with nitrite could radiosensitize hypoxic subcutaneous PC3 tumors.

Many other techniques for reducing tumor hypoxia can be found in the literature. These include fluorocarbon (FC)-based oxygen carriers that can dissolve large amounts of oxygen and

passively diffuse it to hypoxic regions²⁴⁵, or gene therapies based on the development of promoters dependent on the expression of HIF-1²³⁸. However, unlike UTMC therapy, these techniques' components are yet to be approved for clinic and some adverse effects of these antihypoxic agents have been noted²⁴⁶. Definity™ MBs are approved for human treatment and routinely used in clinic for US contrast imaging and would allow rapid transposition of UTMC therapy to the clinic. To our knowledge, this is the first time that UTMC, with or without nitrite injection, has been able to increase perfusion locally and momentarily in a mouse model subcutaneous tumor.

Associated Content

The following files are available free of charge.

- Supplementary Figures Final (.doc)

Corresponding Author *:

François T. H. Yu

francois.yu@umontreal.ca

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was funded in part through the ICM and Université de Montréal (F.Y & F.R.), the Canadian Cancer Research Society (23239 to F.Y). F.Y. and F.R. are researchers of CRCHUM/ICM, which receive support from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). F.Y. is supported

by a FRQS junior 1 career awards (254072) and F.R. by a FRQS senior award (281706). S.M. received scholarships from the TransmedTech Institute through the Canada First Research Excellence Fund and Institut du cancer de Montréal Canderel. There are no relationships with industry to disclose.

Acknowledgements

We thank the animal facility personnel at CRCHUM for the animal care, preparation, and tumor size measurements. We also thank Véronique Barrès and Lilianne Meunier of the molecular pathology of the CRCHUM for performing the scanning of the histology sections. This work was funded in part through the Canadian Cancer Research Society, TransmedTech Institute and Canada First Research Excellence Fund. There are no relationships with industry to disclose.

Abbreviations

eNOS, endothelial Nitric Oxide Synthase; **MB**, Microbubble; **MI**, Mechanical Index; **NO**, Nitric Oxide; **ROI**, Region of Interest; **ROS**, Reactive Oxygen Species; **RT**, Radiotherapy; **US**, Ultrasound; **UTMC**, Ultrasound Targeted Microbubble Cavitation.

Supplementary Figures

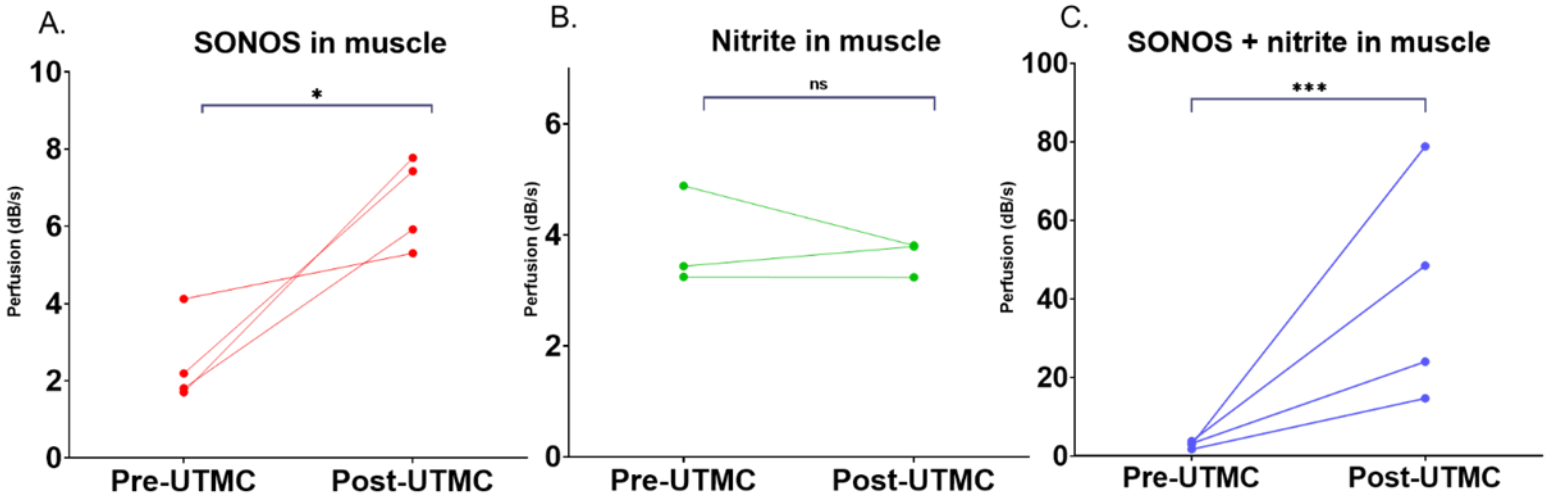


Figure S1: Pre/Post UTMC perfusion values in the hindlimb muscle for various conditions: A. SONOS alone (3.07 ± 1.47 fold-change in perfusion, $* = p < 0.05$, paired t-test); **B.** Nitrite alone group (0.93 ± 0.17 fold-change in perfusion, $p = 0.629$, paired t-test) **C.** SONOS + nitrite (13.74 ± 8.60 fold-change in perfusion, $*** = p < 0.001$, paired t-test).

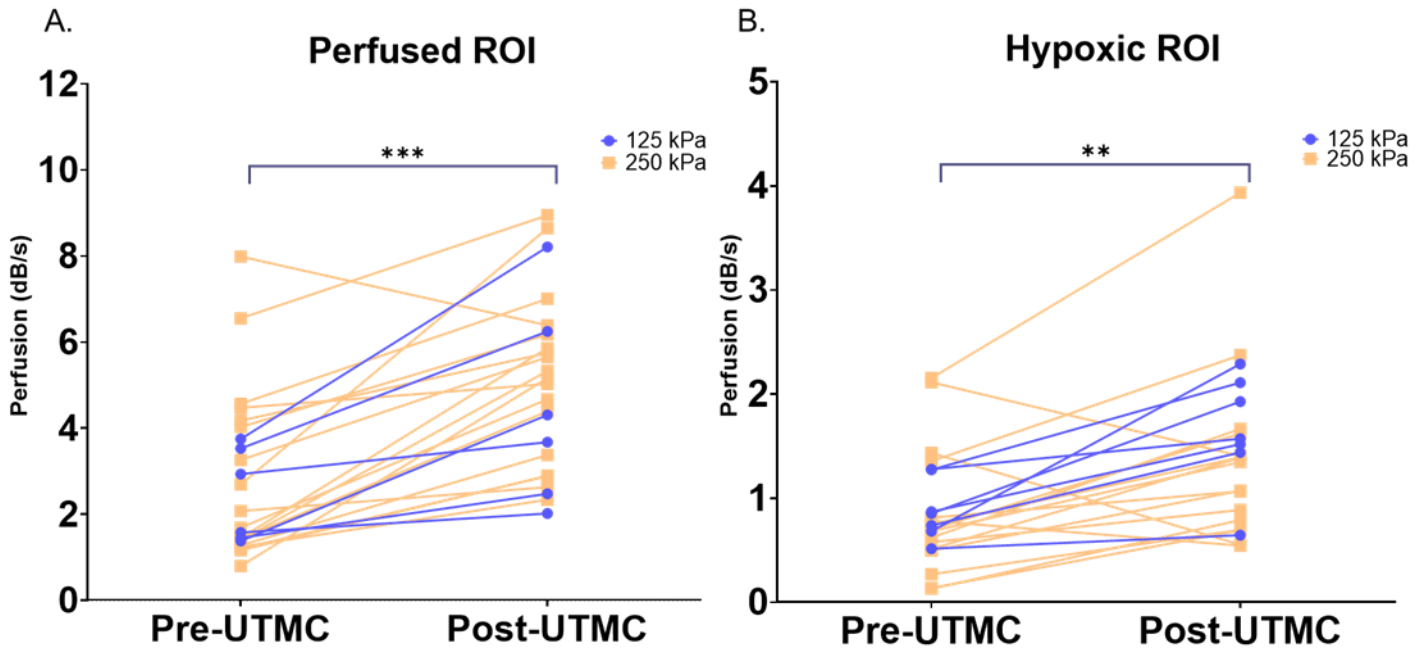


Figure S2: Pre/Post UTMC perfusion values in the tumor following single element transducer treatment (1 MHz/5000cycles): UTMC caused an increase in perfusion with 125 and 250 kPa in: **A.** the Perfused ROI ($*** = p < 0.001$, paired t-test); and **B.** the Hypoxic ROI ($** = p < 0.01$, paired t-test).

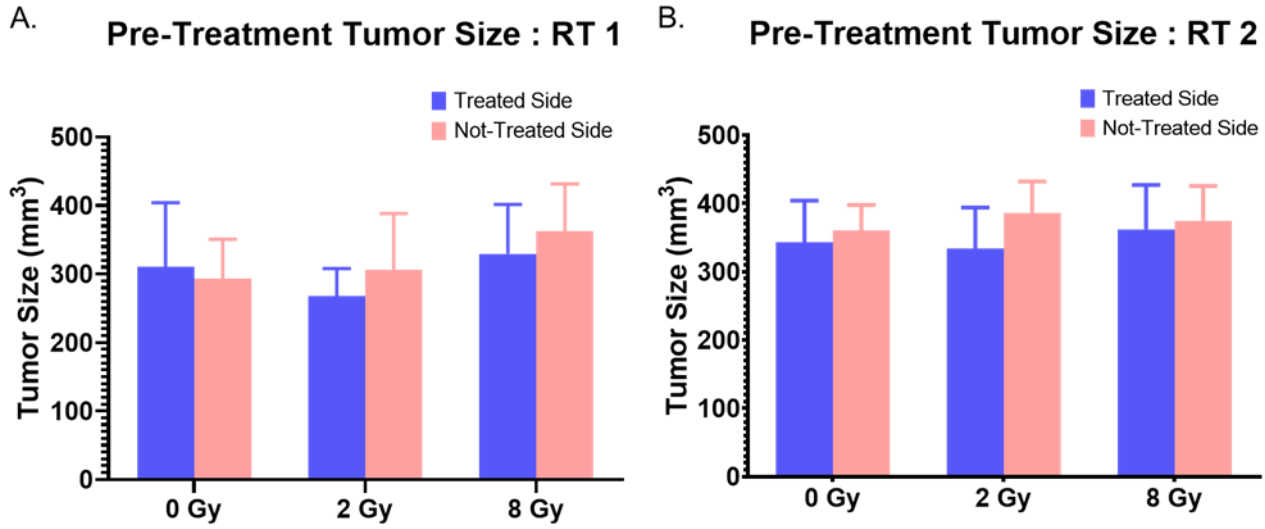


Figure S3: Tumor sizes before radiotherapy for A. RT cohort 1 (N=24) and B. RT cohort 2 (N=46). There was no difference in tumor sizes ($p>0.05$, 2-way ANOVA) for both cohorts.

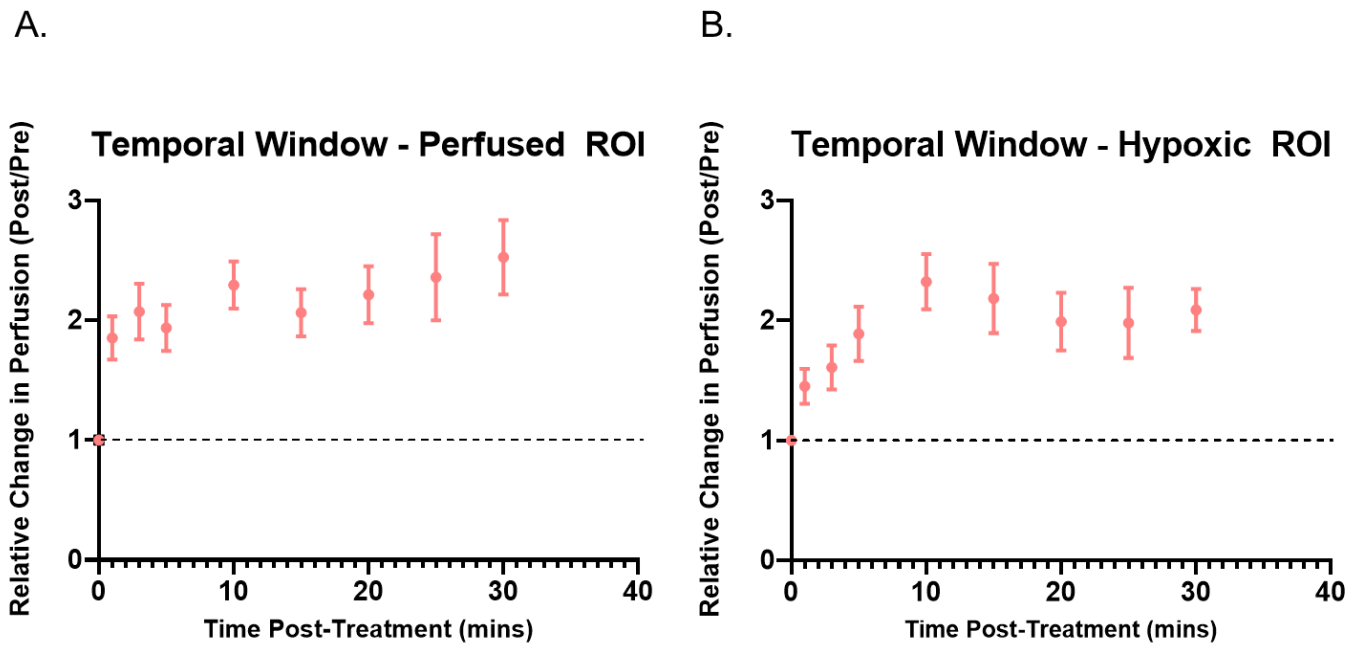


Figure S4: Temporal windows following single element transducer treatment (1 MHz/5000 cycles): Kinetics of provascular response for responsive tumors (tumors with an average relative change in perfusion above 1.25), all pressures combined for A. Perfused ROI and B. Hypoxic ROI.

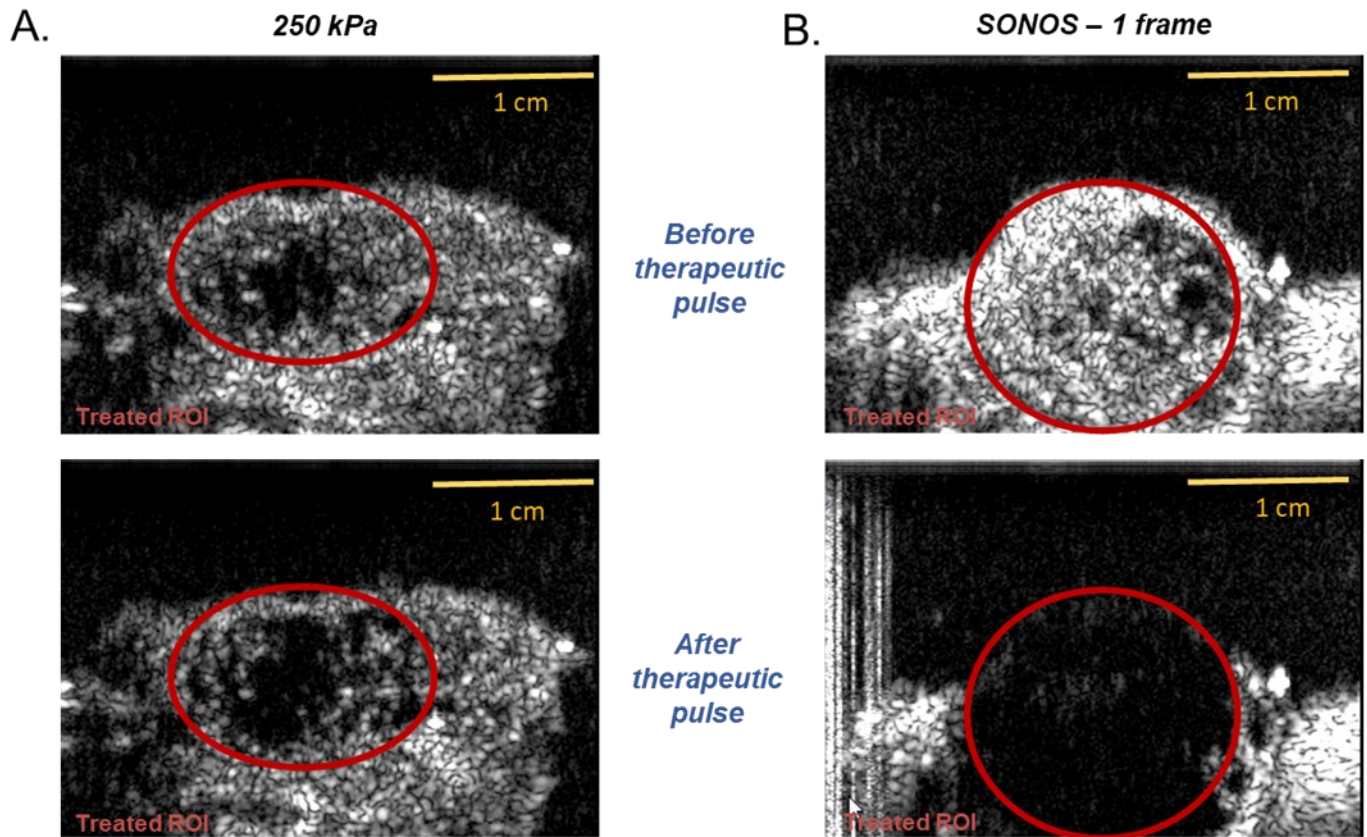


Figure S5: Regions affected by different therapeutic pulses during treatment. A. ROI treated by the 250 kPa therapeutic pulses; B. ROI treated by SONOS therapeutic pulses. Top images illustrate microbubbles' distribution in tumors before the therapeutic pulse; bottom images illustrate the microbubbles' distribution immediately after the pulse.

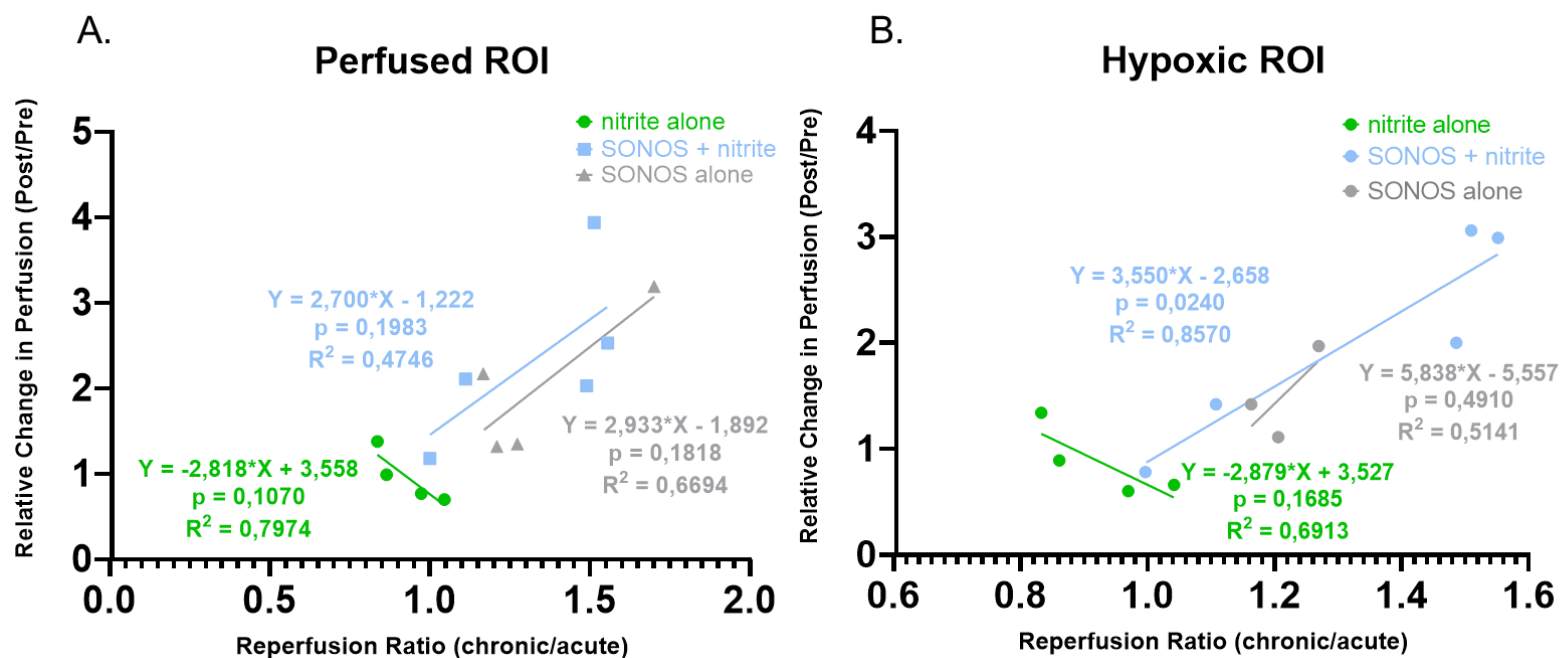


Figure S6: Individual group correlation between histological reperfusion ratio and US relative change in perfusion in (A) tumor Perfused ROI and (B) in tumor Hypoxic ROI. Individual data in hypoxic and perfused ROI showed that only SONOS + nitrite group had a significant correlation in the hypoxic ROI between ultrasound change in perfusion and histological reperfusion ratio. One outlier was identified by the statistical software in the SONOS alone group (Reperfusion ratio of 2.46) in Figs. 6B, C and D and another one in the same group (Relative Change in Perfusion of 10.78) in Fig. 6C and were not considered in the analysis.

Chapitre 6 : Éléments complémentaires

Méthodes

Modèle animal

Afin de valider la pertinence du projet de thérapie provasculaire, un modèle de cellules d'adénocarcinome prostatique humain (lignée PC3, obtenue d'ATCC) fut utilisé. En effet, le cancer de la prostate étant l'un de ceux les plus traités par radiothérapie, réagissant bien mais entraînant des effets adverses à haute dose de radiothérapie^{250,251}, nous avons jugé pertinent de travailler avec une telle lignée. De plus, un des groupes ayant inspiré le projet utilise ce même modèle afin pour leur part d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en augmentant la mort cellulaire des cellules endothéliales, suite à l'exposition de microbulles à des ultrasons¹⁰⁴. Le modèle mâle est choisi de manière conséquente avec le modèle cellulaire utilisé, soit un adénocarcinome prostatique.

Ultrasound Contrast Agents

Les microbulles utilisées pour le projet de thérapie provasculaire ont été obtenues du département d'échocardiographie du CHUM. Comme l'utilisation diagnostique des microbulles chez les humains est soumise à des réglementations plus strictes que chez les animaux, les fioles utilisées pour les échocardiographies cardiaques ne peuvent être utilisées qu'à l'intérieur d'un court laps de temps. Passé cette date de « péremption humaine », ces microbulles étaient récupérées et utilisées pour les études animales. À noter que les microbulles utilisées pour le projet de thérapie provasculaire ne dépassaient pas de plus de deux mois la date de réception des fioles une fois obtenues du CHUM.

Burst Replenishment Imaging - Cineloops Analysis

Une fonction de normalisation a été insérée dans le programme MATLAB utilisé pour quantifier la perfusion. Celle-ci permet de normaliser la concentration de microbulles avec la concentration du vidéo de pré-traitement de référence : la concentration de bulles circulantes étant assez difficile à garder à un seuil précis, il peut être facilement trompeur de conclure en une

augmentation de la perfusion alors qu'il s'agit simplement d'une augmentation ponctuelle de la concentration de microbulles. Afin d'éviter cette fausse interprétation, une fonction de normalisation à partir du muscle adjacent à la tumeur a été ajoutée, permettant de remettre au niveau du pré-traitement la concentration de microbulles circulantes, ce qui fait qu'une augmentation dans la tumeur ne serait qu'attribuable à la thérapie provasculaire et non à une augmentation systémique aléatoire.

Résultats supplémentaires

Évaluation des facteurs influençant la perfusion

Les résultats obtenus en 4.3C montrant un changement dans la perfusion après traitement pour différents groupes sont repris en Fig. comp. 6.1A. Une étude des paramètres A et β de chaque tumeur traitée en fig. comp. 6.1A a ensuite été effectuée en fig. comp. 6.1B et 6.1C. Seul le paramètre β était significatif pour les groupes SONOS + nitrite et 750 kPa (* $p < 0.05$, 2-way ANOVA ; + $p < 0.05$, Tukey post-hoc) lorsque comparé au groupe contrôle négatif (nitrite seul), et l'ordre de grandeur du changement de ce paramètre ($11,67 \pm 5,18$ fois la valeur pré-traitement pour le groupe SONOS + nitrite ; $9,44 \pm 3,94$ fois la valeur pré-traitement pour le groupe 750 kPa) était comparable à l'effet de perfusion mesuré en fig. comp. 6.1A ($13,74 \pm 8,60$ fois la valeur de pré-traitement pour le groupe SONOS + nitrite ; $8,86 \pm 4,82$ fois la valeur pré-traitement pour le groupe 750 kPa), comparativement à une faible augmentation du paramètre A ($1,30 \pm 0,19$ fois la valeur pré-traitement pour le groupe SONOS + nitrite ; $0,92 \pm 0,31$ fois la valeur pré-traitement pour le groupe 750 kPa).

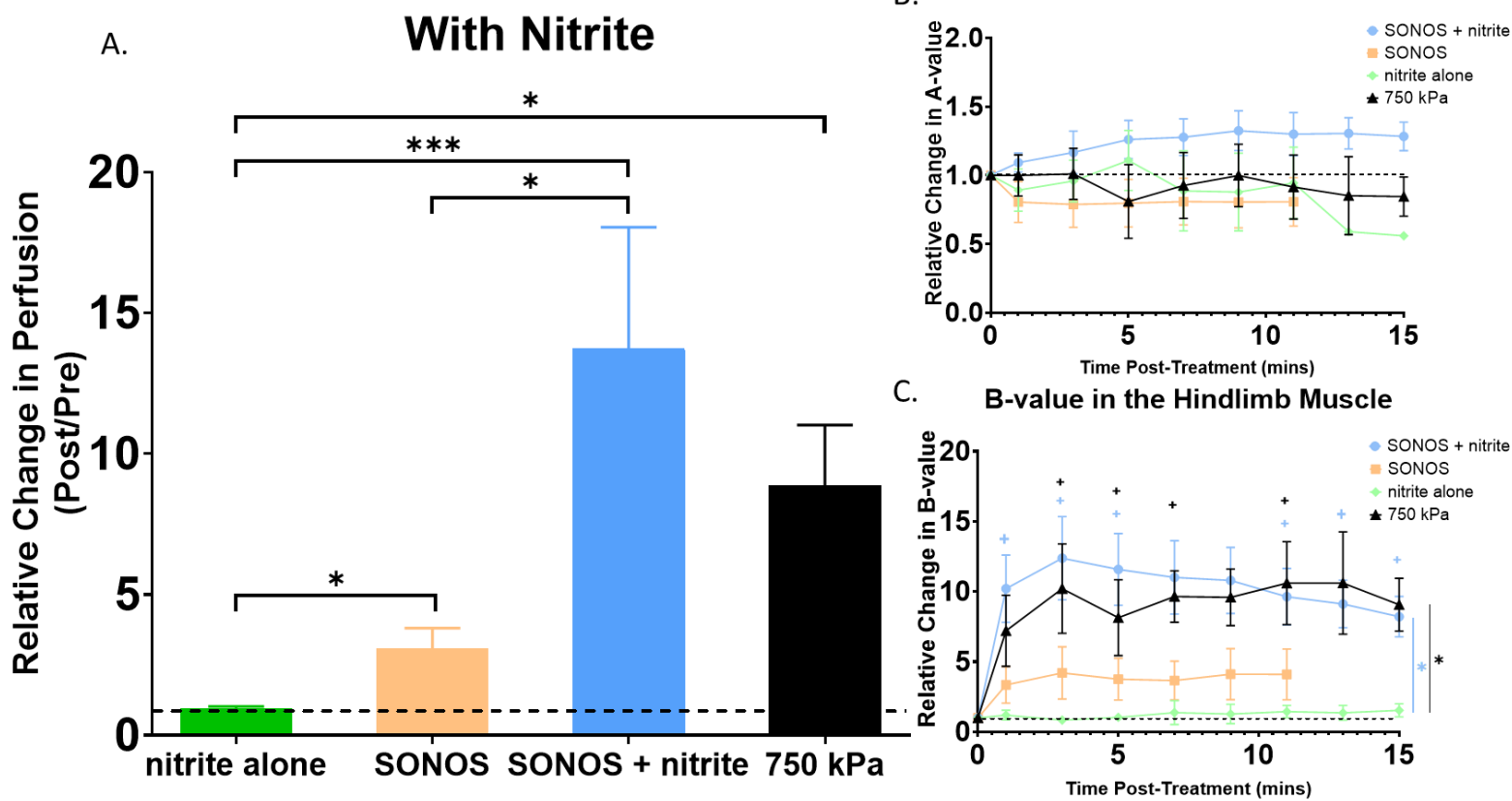


Fig. Compl. 6.1 : Évaluation des paramètres influençant la perfusion. Le changement relatif de perfusion (A.) de tumeurs dans différents groupes tel que représenté dans la figure 4.3C est calculé à partir de la formule : perfusion = $A \times \beta$, où A représente la concentration de microbulles maximale (intensité vidéo, en dB) et β la vitesse de reperfusion (temps pour atteindre 63% de la valeur A, en s^{-1}). Pour les bandes obtenues dans le graphique 6.1A, l'évolution temporelle des paramètres A (graphique 6.1B) et β (graphique 6.1C) ont été produits.

Figure Complémentaire 6.1 : Évaluation des paramètres influençant la perfusion

Relation entre la valeur de perfusion pré-traitement et le changement relatif de perfusion post-traitement

La relation entre la valeur de perfusion pré-traitement absolue (en dB/s) et le changement relatif de perfusion (valeur de perfusion post/valeur de perfusion pré) a été représentée en fig. comp. 6.2A. Une valeur arbitraire de changement relatif de perfusion de 1,5 a été déterminée comme seuil permettant de différencier les répondeurs (changement relatif de perfusion supérieur à 1,5) et les non-répondeurs (changement relatif de perfusion inférieur à 1,5) pour toutes les tumeurs, indépendamment du traitement. Le groupe répondeur avait une valeur de perfusion pré-traitement significativement plus faible que le groupe non-répondeur, tant dans la région

perfusée (fig. comp. 6.2B haut, ** p < 0,01, T-Test) que dans la région hypoxique de la tumeur (fig. comp. 6.2B bas, *** p < 0,005, T-Test). Chez les tumeurs traitées à 250 kPa, une tendance significative tant dans la région perfusée (fig. comp. 6.2C haut, *** p < 0,005, T-Test) que dans la ROI hypoxique (fig. comp. 6.2C bas, *** p < 0,01, T-Test) selon laquelle plus la valeur de perfusion de pré-traitement est élevée, moins le changement relatif de perfusion après traitement sera grand.

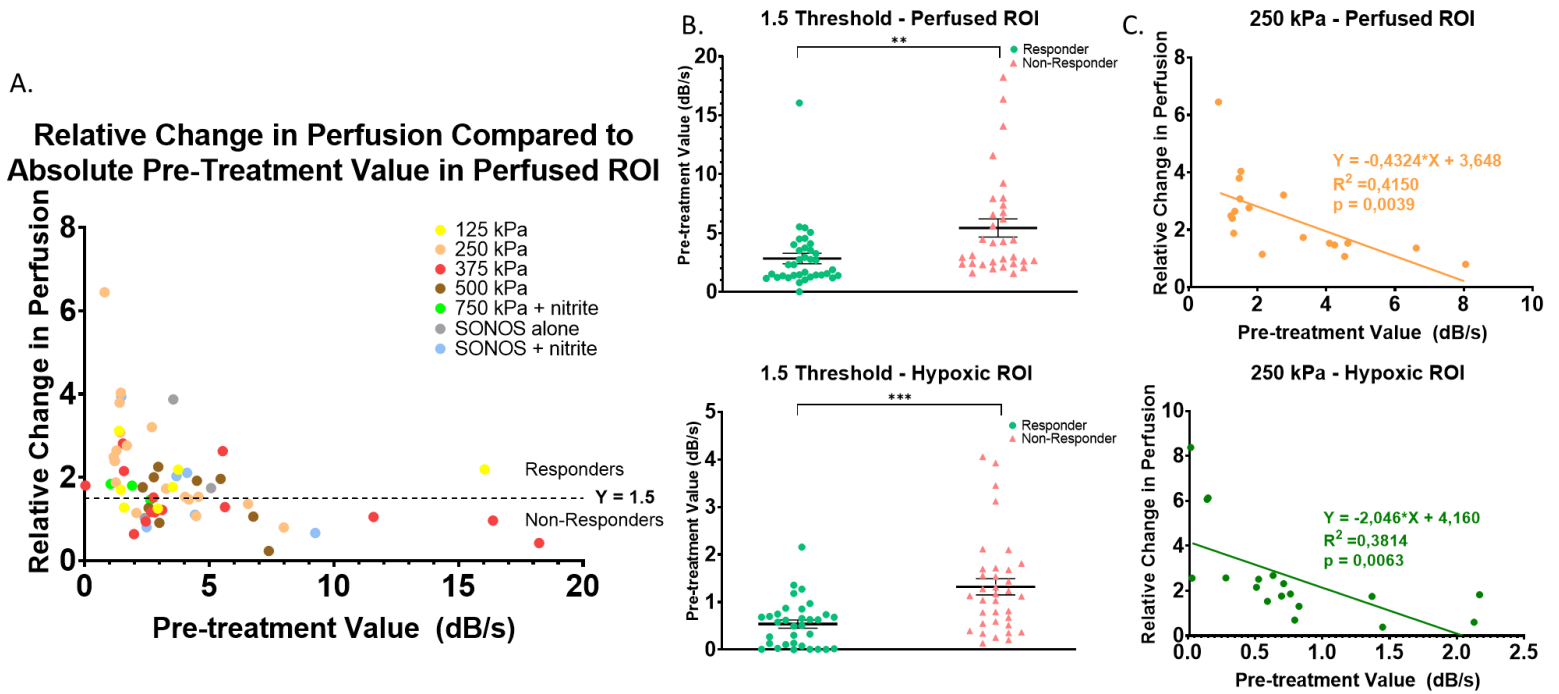


Fig. Compl. 6.2 : Rapport entre la valeur absolue de perfusion pré-traitement et le changement relatif de perfusion post-traitement. Un seuil arbitraire à 1,5 de changement relatif de perfusion a été déterminé pour distinguer répondants et non-répondants (augmentation de 50% de la perfusion post-traitement relativement à la perfusion pré-traitement) (A.). Une ségrégation entre répondants et non-répondants pour les zones perfusées (B, graphique du haut) et hypoxiques (B, graphique du bas) a été effectuée. Les graphiques C montrent la relation entre le changement de perfusion relatif et la valeur de perfusion pré-traitement dans les régions perfusées (haut) et hypoxiques (bas).

Figure Complémentaire 6.2 : Rapport entre la valeur absolue de perfusion pré-traitement et le changement relatif de perfusion post-traitement

Discussion supplémentaire

Influence des paramètres impactant la perfusion

Comme décrit dans l'article de Wei et al. (1998)²⁷², la perfusion peut être quantifiée par imagerie ultrasonore avec agents de contraste comme étant le produit entre le paramètre A (l'intensité

maximale vidéo [dB], correspondant à la concentration maximale de microbulles) et le paramètre β (constante de vitesse [s^{-1}], correspondant à la vitesse de retour des bulles). Les valeurs de perfusion (ou de changement relatif de perfusion) présentées dans la plupart des figures intègrent donc ces deux paramètres, sans cependant pour autant permettre de distinguer l'influence de l'un ou l'autre paramètre. En ce sens, une analyse plus en profondeur des groupes présentés en 3C. (fig. comp. 6.1) quant à l'influence de A et β sur la perfusion nous permet de voir que les courbes de perfusion correspondent grossièrement aux courbes du paramètre β , et que le paramètre A n'exerce qu'une faible influence (fig. comp. 6.1B et 6.1C).

Le paramètre A, reflet du niveau d'intensité du vidéo ou plus simplement de la concentration de microbulles dans la ROI d'intérêt, change donc très peu suite au traitement de thérapie provasculaire. La perfusion est donc plutôt dépendante de la vitesse à laquelle les bulles reviennent (paramètre β). Cela pourrait être tributaire d'une vasodilatation de vaisseaux auparavant plus contractés. La concentration de microbulles ne serait donc pas augmentée, mais on observerait plutôt une augmentation de la quantité desservie par la vascularisation tumorale.

Caractère prédictif de la perfusion initiale

Comme certaines tumeurs ne semblaient pas répondre à la thérapie provasculaire, la capacité prédictive de différents paramètres a été explorée pour voir s'il était possible de catégoriser préalablement au traitement quelles tumeurs répondraient ou non. En plus de la taille (fig. 4.4D), il est possible de conclure que la valeur de perfusion initiale (pré-traitement) a un effet prédictif sur l'augmentation relative de perfusion de cette même tumeur en réponse au traitement. En effet, en séparant les tumeurs répondantes et non-répondantes à un seuil arbitraire de changement relatif de perfusion de 1,5 (correspondant à une augmentation de 50% de la perfusion post-traitement en comparaison à la perfusion pré-traitement), on peut observer une relation significative entre la valeur de perfusion initiale et l'augmentation subséquente de perfusion. Les tumeurs avec une valeur de perfusion pré-traitement plus faible tendent à bénéficier du traitement de thérapie provasculaire de façon plus importante.

Deux pistes de réflexion par rapport à ce phénomène sont envisageables. Tout d'abord, comme le changement relatif de perfusion est plus important chez les tumeurs avec une faible perfusion

initiale, il est possible que le changement absolu soit faible. En ce sens, l'augmentation relative de perfusion élevée n'engendrerait possiblement pas d'effet significatif d'augmentation de l'apport d'oxygène. Cependant, comme la thérapie provasculaire a permis une augmentation significative de l'efficacité de la radiothérapie à 8 Gy, on peut conclure que bien que le changement absolu soit faible, celui-ci est assez important pour engendrer une augmentation de l'apport d'oxygène à la tumeur.

Également, il est possible qu'une valeur de perfusion maximale tumorale (un plateau) soit atteinte, et qu'il soit difficile d'augmenter la perfusion de tissus déjà bien irrigués. On pourrait donc voir chez les tissus avec une haute valeur absolue de perfusion basale une faible augmentation de la perfusion, comme le NO produit n'engendrerait pas de vasodilatation substantielle. Cet effet de plateau a été discuté dans l'article pour expliquer la faible différence entre les groupes SONOS et SONOS + nitrite, et l'effet des nitrites sur le groupe traité à 750 kPa.

Conclusion

Le projet de « thérapie provasculaire anti-cancer à l'aide de microbulles stimulées par ultrasons afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie » aura permis d'explorer en profondeur les interactions entre les microbulles, les ultrasons et l'environnement tumoral murin.

Tout d'abord, peu importe l'intensité du traitement, les MBSU entraînent toujours un important effet d'augmentation de la perfusion dans le muscle; cet effet est encore plus significatif lorsque combiné avec une co-injection de nitrite de sodium. La vascularisation bien développée des tissus musculaires répond donc comme attendu au traitement. Les nitrites seuls n'entraînent aucun changement à la perfusion.

Dans la tumeur, la réponse des vaisseaux est plus capricieuse. Les longs pulses (5000 cycles) à forte pression entraînent un vasospasme, alors seuls ceux à faible pression (125, 250 kPa) créent une réponse provasculaire d'au moins 10 à 15 minutes. Cependant, l'aire insonifiée étant petite avec le transducteur à 1 MHz, l'augmentation de la perfusion (donc d'oxygène) entraînée n'est pas suffisante pour engendrer une réponse à la radiothérapie.

La machine clinique (SONOS) permet quant à elle d'atteindre une région beaucoup plus vaste avec des pulses plus courts mais plus puissants. Ce stress semble être juste assez fort pour entraîner une réponse provasculaire de magnitude similaire à celle engendrée par les longs pulses, mais pas trop intense pour causer un vasospasme, en plus d'atteindre plus de vaisseaux. Cette plus grande région insonifiée était donc clé pour apporter aux tissus tumoraux plus d'oxygène, suffisamment pour que la radiothérapie à 8 Gy en bénéficie. L'augmentation d'oxygène n'est cependant pas assez pour qu'un effet significatif soit encouru à 2 Gy, mais une tendance d'augmentation de l'efficacité peut être observable.

Également, la validation histologique a permis de voir une diminution de l'hypoxie importante pour la tumeur en entier lorsque traitée avec SONOS + nitrite. La réponse provasculaire de ce traitement est donc assez généralisé pour entraîner une différence significative dans le niveau d'oxygène. La plus grande région insonifiée peut possiblement permettre au nitrite d'affecter les vaisseaux péri-tumoraux – qui répondraient peut-être plus comme les vaisseaux musculaires au nitrite – et de créer un apport global d'oxygène plus grand à la tumeur, bien que cela ne se traduise pas nécessairement en une augmentation de perfusion à l'ultrason. Un bon indice de l'augmentation de la perfusion est que le changement de celle-ci est tributaire principalement de l'augmentation de la vitesse de reperfusion (paramètre β). Les vaisseaux en amont à la région traitée sont probablement vasodilatés par le traitement, ce qui entraîne une vitesse de retour sanguin plus grande et plus d'oxygène aux tissus. Pour le groupe SONOS + nitrite, la diminution histologique de l'hypoxie de la tumeur était corrélée à sa reperfusion. Le peu de sang qui y parvenait avant traitement contenait probablement très peu d'oxygène; le traitement provasculaire permet donc une augmentation d'oxygène par diffusion mais également par perfusion, ce qui est essentiel au traitement subséquent de radiothérapie.

De plus, le traitement de thérapie provasculaire est le plus efficace chez les plus grosses tumeurs, en périphérie. La vascularisation plus mature et plus fonctionnelle de ces vaisseaux, possiblement plus semblable à celle des muscles, est donc importante pour une réponse provasculaire.

L'effet du nitrite semble être limité dans les vaisseaux tumoraux. L'effet « donneur de NO » semble atteindre rapidement un plateau dans les vaisseaux centraux de la tumeur, comme aucun

changement entre les groupes SONOS et SONOS + nitrite n'est observable; cependant, le vasospasme de tumeurs traitées à 750 kPa se résorbe après injection de nitrite pour atteindre les valeurs de perfusion des autres groupes post-traitement. Ainsi les vaisseaux tumoraux, contrairement aux vaisseaux des muscles, répondent mais de manière limitée au nitrite. Cet effet de plateau est également visible dans la prédictivité de la réponse : les tumeurs avec une valeur de perfusion initiale plus grande sont moins propices d'avoir une forte augmentation de perfusion après traitement.

En somme, il semble importer d'augmenter la vasodilatation du plus grand nombre de vaisseaux (donc essayer d'affecter la plus grande région possible), au lieu de se concentrer sur une plus forte augmentation de perfusion mais d'un nombre plus restreint de vaisseaux. En effet, la vascularisation tumorale étant moins répondeuse aux traitements et aux drogues, le fait de ratisser large en périphérie et autour de la tumeur pour ainsi possiblement atteindre des vaisseaux plus matures ou fonctionnels est plus propice d'engranger une reperfusion globale.

Contributions

Ces travaux ont permis de comprendre et d'approfondir les connaissances sur la relation provasculaire engendrée par la stimulation de microbulles par ultrasons sur les cellules tumorales. À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de l'augmentation de la perfusion tumorale à la suite d'une stimulation de MBSU, avec ou sans co-injection de nitrite. De plus, il s'agit également de la première preuve d'augmentation de l'efficacité de la radiothérapie à 8 Gy après injection de nitrite et stimulation par microbulles et ultrasons chez un modèle tumoral murin.

Perspective

À terme, le projet de thérapie provasculaire par microbulles stimulées par ultrasons serait utilisé de manière clinique comme adjuvant à la radiothérapie, afin de permettre de réduire les doses de radiation utilisées pour obtenir un résultat similaire ou meilleur que ce qui se fait en ce moment.

Références bibliographiques

1. Yu, F. T. H., Chen, X., Straub, A. C. & Pacella, J. J. The Role of Nitric Oxide during Sonoreperfusion of Microvascular Obstruction. *Theranostics* **7**, 3527–3538 (2017).
2. Su, C.-H., Yeh, H.-I., Hou, C. J.-Y. & Tsai, C.-H. Nonviral Technologies for Gene Therapy in Cardiovascular Research. *Int. J. Gerontol.* **2**, 35–47 (2008).
3. Bushberg, J. T. *The Essential Physics of Medical Imaging*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2002).
4. Early use of ultrasound for a medical purpose. *Contemporary OB/GYN*
<https://www.contemporaryobgyn.net/view/early-use-ultrasound-medical-purpose>.
5. Smith-Bindman, R. *et al.* Trends in Use of Medical Imaging in US Health Care Systems and in Ontario, Canada, 2000-2016. *JAMA* **322**, 843–856 (2019).
6. Lento, P. H. & Primack, S. Advances and utility of diagnostic ultrasound in musculoskeletal medicine. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* **1**, 24–31 (2007).
7. Carovac, A., Smajlovic, F. & Junuzovic, D. Application of Ultrasound in Medicine. *Acta Inform. Medica* **19**, 168–171 (2011).
8. Feinstein, S. B. *et al.* Contrast enhanced ultrasound imaging. *J. Nucl. Cardiol.* **17**, 106–115 (2010).
9. Miller, D. *et al.* Overview of Therapeutic Ultrasound Applications and Safety Considerations. *J. Ultrasound Med. Off. J. Am. Inst. Ultrasound Med.* **31**, 623–634 (2012).
10. Alexander, L. D., Gilman, D. R. D., Brown, D. R., Brown, J. L. & Houghton, P. E. Exposure to low amounts of ultrasound energy does not improve soft tissue shoulder pathology: a systematic review. *Phys. Ther.* **90**, 14–25 (2010).

11. Malietzis, G. *et al.* High-intensity focused ultrasound: advances in technology and experimental trials support enhanced utility of focused ultrasound surgery in oncology. *Br. J. Radiol.* **86**, 20130044 (2013).
12. Zhou, Y.-F. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World J. Clin. Oncol.* **2**, 8–27 (2011).
13. Copelan, A., Hartman, J., Chehab, M. & Venkatesan, A. M. High-Intensity Focused Ultrasound: Current Status for Image-Guided Therapy. *Semin. Interv. Radiol.* **32**, 398–415 (2015).
14. Izadifar, Z., Izadifar, Z., Chapman, D. & Babyn, P. An Introduction to High Intensity Focused Ultrasound: Systematic Review on Principles, Devices, and Clinical Applications. *J. Clin. Med.* **9**, 460 (2020).
15. van den Bijgaart, R. J. E. *et al.* Thermal and mechanical high-intensity focused ultrasound: perspectives on tumor ablation, immune effects and combination strategies. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **66**, 247–258 (2017).
16. Gramiak, R. & Shah, P. M. Echocardiography of the aortic root. *Invest. Radiol.* **3**, 356–366 (1968).
17. Mayer, S. & Grayburn, P. A. Myocardial contrast agents: recent advances and future directions. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **44**, 33–44 (2001).
18. Bouakaz, A., de Jong, N., Cachard, C. & Jouini, K. On the effect of lung filtering and cardiac pressure on the standard properties of ultrasound contrast agent. *Ultrasonics* **36**, 703–708 (1998).
19. Dijkmans, P. A. *et al.* Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *Eur. J. Echocardiogr.* **5**, 245–246 (2004).

20. Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Sci. Eng. Technol.* **1**, 3–17 (2009).
21. Bzyl, J. *et al.* Molecular and functional ultrasound imaging in differently aggressive breast cancer xenografts using two novel ultrasound contrast agents (BR55 and BR38). *Eur. Radiol.* **21**, 1988–1995 (2011).
22. Grinstaff, M. W. & Suslick, K. S. Air-filled proteinaceous microbubbles: synthesis of an echo-contrast agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7708–7710 (1991).
23. Cavalieri, F., Ashokkumar, M., Grieser, F. & Caruso, F. Ultrasonic synthesis of stable, functional lysozyme microbubbles. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **24**, 10078–10083 (2008).
24. Korpanty, G., Grayburn, P. A., Shohet, R. V. & Brekken, R. A. Targeting vascular endothelium with avidin microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 1279–1283 (2005).
25. Singhal, S., Moser, C. C. & Wheatley, M. A. Surfactant-stabilized microbubbles as ultrasound contrast agents: stability study of Span 60 and Tween 80 mixtures using a Langmuir trough. *Langmuir* **9**, 2426–2429 (1993).
26. Wang, W., Moser, C. C. & Wheatley, M. A. Langmuir Trough Study of Surfactant Mixtures Used in the Production of a New Ultrasound Contrast Agent Consisting of Stabilized Microbubbles. *J. Phys. Chem.* **100**, 13815–13821 (1996).
27. Dressaire, E., Bee, R., Bell, D. C., Lips, A. & Stone, H. A. Interfacial polygonal nanopatterning of stable microbubbles. *Science* **320**, 1198–1201 (2008).
28. Cavalieri, F., El Hamassi, A., Chiessi, E. & Paradossi, G. Stable polymeric microballoons as multifunctional device for biomedical uses: synthesis and characterization. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **21**, 8758–8764 (2005).

29. Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Sci. Eng. Technol.* **1**, 3–17 (2009).
30. Duncan, P. B. & Needham, D. Test of the Epstein-Plesset model for gas microparticle dissolution in aqueous media: effect of surface tension and gas undersaturation in solution. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **20**, 2567–2578 (2004).
31. Unnikrishnan, S. & Klibanov, A. L. Microbubbles as Ultrasound Contrast Agents for Molecular Imaging: Preparation and Application. *Am. J. Roentgenol.* **199**, 292–299 (2012).
32. Kim, D. H., Costello, M. J., Duncan, P. B. & Needham, D. Mechanical Properties and Microstructure of Polycrystalline Phospholipid Monolayer Shells: Novel Solid Microparticles. *Langmuir* **19**, 8455–8466 (2003).
33. Morgan, K. E. *et al.* Experimental and theoretical evaluation of microbubble behavior: effect of transmitted phase and bubble size. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **47**, 1494–1509 (2000).
34. Bloch, S. H., Wan, M., Dayton, P. A. & Ferrara, K. W. Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 631–633 (2004).
35. Klibanov, A. L. Ligand-carrying gas-filled microbubbles: ultrasound contrast agents for targeted molecular imaging. *Bioconjug. Chem.* **16**, 9–17 (2005).
36. Blomley, M. J. K., Cooke, J. C., Unger, E. C., Monaghan, M. J. & Cosgrove, D. O. Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ* **322**, 1222–1225 (2001).
37. Tinkov, S., Bekeredjian, R., Winter, G. & Coester, C. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *J. Pharm. Sci.* **98**, 1935–1961 (2009).

38. Li, H. *et al.* Acoustic Characterization and Enhanced Ultrasound Imaging of Long-Circulating Lipid-Coated Microbubbles. *J. Ultrasound Med.* **37**, 1243–1256 (2018).
39. Wu, S.-K. *et al.* Characterization of Different Microbubbles in Assisting Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening. *Sci. Rep.* **7**, 46689 (2017).
40. Frinking, P., Segers, T., Luan, Y. & Tranquart, F. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements. *Ultrasound Med. Biol.* **46**, 892–908 (2020).
41. Morgan, M. A. Acoustic impedance | Radiology Reference Article | Radiopaedia.org. *Radiopaedia* <https://radiopaedia.org/articles/acoustic-impedance>.
42. Themes, U. F. O. Science of Ultrasound and Echocardiography. *Thoracic Key* <https://thoracickey.com/science-of-ultrasound-and-echocardiography/> (2017).
43. Versluis, M., Stride, E., Lajoinie, G., Dollet, B. & Segers, T. Ultrasound Contrast Agent Modeling: A Review. *Ultrasound Med. Biol.* **46**, 2117–2144 (2020).
44. Shi, W. T. & Forsberg, F. Ultrasonic characterization of the nonlinear properties of contrast microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, 93–104 (2000).
45. Lee, H. *et al.* Microbubbles used for contrast enhanced ultrasound and theragnosis: a review of principles to applications. *Biomed. Eng. Lett.* **7**, 59–69 (2017).
46. Izadifar, Z., Babyn, P. & Chapman, D. Ultrasound Cavitation/Microbubble Detection and Medical Applications. *J. Med. Biol. Eng.* **39**, 259–276 (2019).
47. Şen, T., Tüfekçioğlu, O. & Koza, Y. Mechanical index. *Anatol. J. Cardiol.* **15**, 334–336 (2015).
48. Li, Y., Chen, Y., Du, M. & Chen, Z.-Y. Ultrasound Technology for Molecular Imaging: From Contrast Agents to Multimodal Imaging. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 2716–2728 (2018).

49. Averkiou, M. A., Mannaris, C., Bruce, M. & Powers, J. Nonlinear pulsing schemes for the detection of ultrasound contrast agents. *J. Acoust. Soc. Am.* **123**, 3110–3110 (2008).
50. Eckersley, R. J., Chin, C. T. & Burns, P. N. Optimising phase and amplitude modulation schemes for imaging microbubble contrast agents at low acoustic power. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 213–219 (2005).
51. Miller, M. W., Miller, D. L. & Brayman, A. A. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med. Biol.* **22**, 1131–1154 (1996).
52. Sirsi, S. R. & Borden, M. A. Advances in ultrasound mediated gene therapy using microbubble contrast agents. *Theranostics* **2**, 1208–1222 (2012).
53. Church, C. C. & Carstensen, E. L. “Stable” inertial cavitation. *Ultrasound Med. Biol.* **27**, 1435–1437 (2001).
54. Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S. C. & Moonen, C. T. W. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **72**, 49–64 (2014).
55. Fan, Z., Kumon, R. E. & Deng, C. X. Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery. *Ther. Deliv.* **5**, 467–486 (2014).
56. Doinikov, A. A. & Bouakaz, A. Theoretical investigation of shear stress generated by a contrast microbubble on the cell membrane as a mechanism for sonoporation. *J. Acoust. Soc. Am.* **128**, 11–19 (2010).
57. Zhao, Y.-Z. *et al.* Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro. *J. Drug Target.* **16**, 18–25 (2008).

58. Tran, T. A., Roger, S., Le Guennec, J. Y., Tranquart, F. & Bouakaz, A. Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound Med. Biol.* **33**, 158–163 (2007).
59. Yang, Y., Li, Q., Guo, X., Tu, J. & Zhang, D. Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells. *Ultrason. Sonochem.* **67**, 105096 (2020).
60. Verma, I. M. & Somia, N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239–242 (1997).
61. Bekeredjian, R., Chen, S., Grayburn, P. A. & Shohet, R. V. Augmentation of cardiac protein delivery using ultrasound targeted microbubble destruction. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 687–691 (2005).
62. Huang, C., Zhang, H. & Bai, R. Advances in ultrasound-targeted microbubble-mediated gene therapy for liver fibrosis. *Acta Pharm. Sin. B* **7**, 447–452 (2017).
63. Wan, C., Li, F. & Li, H. Gene therapy for ocular diseases mediated by ultrasound and microbubbles (Review). *Mol. Med. Rep.* **12**, 4803–4814 (2015).
64. Paefgen, V., Doleschel, D. & Kiessling, F. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* **6**, 197 (2015).
65. Porter, T. R., LeVein, R. F., Fox, R., Kricsfeld, A. & Xie, F. Thrombolytic enhancement with perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *Am. Heart J.* **132**, 964–968 (1996).
66. Datta, S. *et al.* Ultrasound-enhanced thrombolysis using Definity as a cavitation nucleation agent. *Ultrasound Med. Biol.* **34**, 1421–1433 (2008).

67. Cintas, P., Nguyen, F., Boneu, B. & Larrue, V. Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2**, 1163–1166 (2004).
68. Leeman, J. E. *et al.* Effect of acoustic conditions on microbubble-mediated microvascular sonothrombolysis. *Ultrasound Med. Biol.* **38**, 1589–1598 (2012).
69. Everbach, E. C. & Francis, C. W. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, 1153–1160 (2000).
70. Stride, E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* **27 Suppl 2**, 1–13 (2009).
71. Weiss, H. L. *et al.* Mechanical clot damage from cavitation during sonothrombolysis. *J. Acoust. Soc. Am.* **133**, 3159–3175 (2013).
72. Tung, Y.-S., Vlachos, F., Feshitan, J. A., Borden, M. A. & Konofagou, E. E. The mechanism of interaction between focused ultrasound and microbubbles in blood-brain barrier opening in mice. *J. Acoust. Soc. Am.* **130**, 3059–3067 (2011).
73. Yang, F.-Y., Fu, W.-M., Chen, W.-S., Yeh, W.-L. & Lin, W.-L. Quantitative evaluation of the use of microbubbles with transcranial focused ultrasound on blood-brain-barrier disruption. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 636–643 (2008).
74. Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N. & Jolesz, F. A. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. *Acta Neurochir. Suppl.* **86**, 555–558 (2003).
75. Wood, A. K. W. & Sehgal, C. M. A Review of Low-Intensity Ultrasound for Cancer Therapy. *Ultrasound Med. Biol.* **41**, 905–928 (2015).
76. Chen, H. *et al.* Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy. *Drug Discov. Today* **19**, 502–509 (2014).

77. Gao, Z. *et al.* Sonodynamic therapy inhibits angiogenesis and tumor growth in a xenograft mouse model. *Cancer Lett.* **335**, 93–99 (2013).
78. Ohmura, T. *et al.* Sonodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid and Focused Ultrasound for Deep-seated Intracranial Glioma in Rat. *Anticancer Res.* **31**, 2527–2533 (2011).
79. Roovers, S. *et al.* The Role of Ultrasound-Driven Microbubble Dynamics in Drug Delivery: From Microbubble Fundamentals to Clinical Translation. *Langmuir* **35**, 10173–10191 (2019).
80. Kooiman, K., Vos, H. J., Versluis, M. & de Jong, N. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **72**, 28–48 (2014).
81. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **358**, 1576–1585 (2001).
82. Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. & Ferris, R. L. Head and neck cancer. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 1695–1709 (2008).
83. Chowdhury, S. M., Lee, T. & Willmann, J. K. Ultrasound-guided drug delivery in cancer. *Ultrasonography* **36**, 171–184 (2017).
84. Zhou, Q.-L. *et al.* Ultrasound-Mediated Local Drug and Gene Delivery Using Nanocarriers. *BioMed Research International* vol. 2014 e963891 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/963891/> (2014).
85. Yan, F. *et al.* Paclitaxel-liposome–microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J. Controlled Release* **166**, 246–255 (2013).
86. Bull, J. L. The application of microbubbles for targeted drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **4**, 475–493 (2007).

87. Carson, A. R. *et al.* Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction to Deliver siRNA Cancer Therapy. *Cancer Res.* **72**, 6191–6199 (2012).
88. Li, Y. S., Davidson, E., Reid, C. N. & McHale, A. P. Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: Potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer Lett.* **273**, 62–69 (2009).
89. Tu, J., Zhang, H., Yu, J., Liufu, C. & Chen, Z. Ultrasound-mediated microbubble destruction: a new method in cancer immunotherapy. *OncoTargets Ther.* **11**, 5763–5775 (2018).
90. Kapadia, C. H., Perry, J. L., Tian, S., Luft, J. C. & DeSimone, J. M. Nanoparticulate immunotherapy for cancer. *J. Controlled Release* **219**, 167–180 (2015).
91. Suzuki, R. *et al.* A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *J. Controlled Release* **133**, 198–205 (2009).
92. Kobus, T., Zervantonakis, I. K., Zhang, Y. & McDannold, N. J. Growth inhibition in a brain metastasis model by antibody delivery using focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption. *J. Controlled Release* **238**, 281–288 (2016).
93. Yang, Q. *et al.* Low-Intensity Ultrasound-Induced Anti-inflammatory Effects Are Mediated by Several New Mechanisms Including Gene Induction, Immunosuppressor Cell Promotion, and Enhancement of Exosome Biogenesis and Docking. *Front. Physiol.* **8**, 818 (2017).
94. Zhang, W., Shou, W.-D., Xu, Y.-J., Bai, W.-K. & Hu, B. Low-frequency ultrasound-induced VEGF suppression and synergy with dendritic cell-mediated anti-tumor immunity in murine prostate cancer cells in vitro. *Sci. Rep.* **7**, 5778 (2017).
95. Shi, C. *et al.* Combined effect of ultrasound/SonoVue microbubble on CD4+CD25+ regulatory T cells viability and optimized parameters for its transfection. *Ultrasonics* **62**, 97–102 (2015).

96. Hillen, F. & Griffioen, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 489–502 (2007).
97. Vaupel, P. Abnormal Microvasculature and Defective Microcirculatory Function in Solid Tumors. in *Vascular-Targeted Therapies in Oncology* 9–29 (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/0470035439.ch2.
98. Wood, A. K. W. *et al.* The antivasular action of physiotherapy ultrasound on murine tumors. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 1403–1410 (2005).
99. Holland, C. K. & Apfel, R. E. Thresholds for transient cavitation produced by pulsed ultrasound in a controlled nuclei environment. *J. Acoust. Soc. Am.* **88**, 2059–2069 (1990).
100. Lauterborn, W. & Ohl, C.-D. Cavitation bubble dynamics. *Ultrason. Sonochem.* **4**, 65–75 (1997).
101. Wood, A. *et al.* The Disruption of Murine Tumor Neovasculature by Low-intensity Ultrasound – comparison between 1 MHz and 3 MHz sonication frequencies. *Acad. Radiol.* **15**, 1133–1141 (2008).
102. Wood, A. K. W., Schultz, S. M., Lee, W. M.-F., Bunte, R. M. & Sehgal, C. M. Antivasular Ultrasound Therapy Extends Survival of Mice With Implanted Melanomas. *Ultrasound Med. Biol.* **36**, 853–857 (2010).
103. Bunte, R. M., Ansaloni, S., Sehgal, C. M., Lee, W. M.-F. & Wood, A. K. W. Histopathological observations of the antivasular effects of physiotherapy ultrasound on a murine neoplasm. *Ultrasound Med. Biol.* **32**, 453–461 (2006).
104. Czarnota, G. J. *et al.* Tumor radiation response enhancement by acoustical stimulation of the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2033–E2041 (2012).

105. Wu, J. Shear stress in cells generated by ultrasound. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 363–373 (2007).
106. VanBavel, E. Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 374–383 (2007).
107. Traub, O. & Berk, B. C. Laminar Shear Stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 677–685 (1998).
108. Esplugues, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1079–1095 (2002).
109. Brüne, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* **10**, 864–869 (2003).
110. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907–916 (2001).
111. Wang, G.-R., Zhu, Y., Halushka, P. V., Lincoln, T. M. & Mendelsohn, M. E. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4888–4893 (1998).
112. Chen, K., Pittman, R. N. & Popel, A. S. Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go? A Quantitative Perspective. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1185–1198 (2008).
113. Cohen, R. A. *et al.* Mechanism of Nitric Oxide–Induced Vasodilatation. *Circ. Res.* **84**, 210–219 (1999).
114. Atherosclerosis. *Panacea* or *Hygeia*
<https://medicalmyths.wordpress.com/atherosclerosis/> (2008).

115. Sonveaux, P., Jordan, B. F., Gallez, B. & Feron, O. Nitric oxide delivery to cancer: why and how? *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 **45**, 1352–1369 (2009).
116. Gallez, B., Jordan, B. F., Baudelet, C. & Misson, P. D. Pharmacological modifications of the partial pressure of oxygen in murine tumors: evaluation using in vivo EPR oximetry. *Magn. Reson. Med.* **42**, 627–630 (1999).
117. Sonveaux, P. *et al.* Oxygen regulation of tumor perfusion by S-nitrosohemoglobin reveals a pressor activity of nitric oxide. *Circ. Res.* **96**, 1119–1126 (2005).
118. Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 156–167 (2008).
119. Frérart, F. *et al.* The acidic tumor microenvironment promotes the reconversion of nitrite into nitric oxide: towards a new and safe radiosensitizing strategy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 2768–2774 (2008).
120. Miyamoto, L. *et al.* Nitrite Activates 5'AMP-Activated Protein Kinase-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Glomerular Endothelial Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1866–1872 (2017).
121. Gladwin, M. T. *et al.* The emerging biology of the nitrite anion. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 308–314 (2005).
122. Vanin, A. F., Bevers, L. M., Slama-Schwok, A. & van Faassen, E. E. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **64**, 96–103 (2007).
123. Yu, G. Z. *et al.* Ultrasound-Targeted Microbubble Cavitation with Sodium Nitrite Synergistically Enhances Nitric Oxide Production and Microvascular Perfusion. *Ultrasound Med. Biol.* (2019) doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.10.012.

124. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
125. Patel, A. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol.* **6**, 1488 (2020).
126. Danaei, G., Hoorn, S. V., Lopez, A. D., Murray, C. J. & Ezzati, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet* **366**, 1784–1793 (2005).
127. Blackadar, C. B. Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol.* **7**, 54–86 (2016).
128. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
129. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
130. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F. & Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* **3**, 83–92 (2015).
131. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
132. Semenza, G. L. Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2010).
133. Rohwer, N. *et al.* HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br. J. Cancer* **100**, 772–781 (2009).
134. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Luderer, M. & Azab, A. K. The role of hypoxia and exploitation of the hypoxic environment in hematologic malignancies. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 1347–1354 (2014).
135. Schiller, J. H. *et al.* Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 92–98 (2002).

136. Zugazagoitia, J. *et al.* Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin. Ther.* **38**, 1551–1566 (2016).
137. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 651–668 (2020).
138. Robert, C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat. Commun.* **11**, 3801 (2020).
139. Seidel, J. A., Otsuka, A. & Kabashima, K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front. Oncol.* **8**, 86 (2018).
140. Fife, B. T. & Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* **224**, 166–182 (2008).
141. Rohaan, M. W., Wilgenhof, S. & Haanen, J. B. A. G. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **474**, 449–461 (2019).
142. Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C. & Fraietta, J. A. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am. J. Hematol.* **94**, S3–S9 (2019).
143. Hendry, S. *et al.* Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv. Anat. Pathol.* **24**, 235–251 (2017).
144. Kim, B. K., Han, K.-H. & Ahn, S. H. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Oncology* **81 Suppl 1**, 41–49 (2011).
145. Roden, R. B. S. & Stern, P. L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 240–254 (2018).

146. Hollingsworth, R. E. & Jansen, K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines* **4**, 1–10 (2019).
147. Mondal, M., Guo, J., He, P. & Zhou, D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **16**, 2389–2402 (2020).
148. Raman, S. S., Hecht, J. R. & Chan, E. Talimogene laherparepvec: review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. *Immunotherapy* **11**, 705–723 (2019).
149. Bhullar, K. S. *et al.* Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer* **17**, 48 (2018).
150. Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C. & Hoeflich, K. P. Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **125**, 1780–1789 (2015).
151. Shaw, A. T. *et al.* Ceritinib in ALK-Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1189–1197 (2014).
152. Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **25**, 282–303 (2014).
153. Chapman, P. B. *et al.* Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
154. Henderson, B. E. & Feigelson, H. S. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**, 427–433 (2000).
155. Fairchild, A. *et al.* Hormonal therapy in oncology: a primer for the radiologist. *AJR Am. J. Roentgenol.* **204**, W620-630 (2015).
156. Schmidt, S. *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* **11**, S45–S55 (2004).

157. El-Kenawi, A. E. & El-Remessy, A. B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 712–729 (2013).
158. Haibe, Y. *et al.* Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 221 (2020).
159. Ellis, L. M. & Hicklin, D. J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 579–591 (2008).
160. Sakurai, A., Doçi, C. L., Doci, C. & Gutkind, J. S. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res.* **22**, 23–32 (2012).
161. Eichmann, A., Makinen, T. & Alitalo, K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev.* **19**, 1013–1021 (2005).
162. Van der Veldt, A. A. M. *et al.* Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell* **21**, 82–91 (2012).
163. Katoh, M. & Nakagama, H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med. Res. Rev.* **34**, 280–300 (2014).
164. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 65–72 (2005).
165. Schirrmacher, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int. J. Oncol.* **54**, 407–419 (2018).
166. Morgan, G., Ward, R. & Barton, M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **16**, 549–560 (2004).

167. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget* **8**, 62742–62758 (2017).
168. Verellen, D. *et al.* Innovations in image-guided radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 949–960 (2007).
169. Farooque, A. *et al.* Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11**, 791–802 (2011).
170. Torok, J. A. *et al.* Low-Dose Consolidation Radiation Therapy for Early Stage Unfavorable Hodgkin Lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **92**, 54–59 (2015).
171. Barnett, G. C. *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 134–142 (2009).
172. Durante, M., Orecchia, R. & Loeffler, J. S. Charged-particle therapy in cancer: clinical uses and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 483–495 (2017).
173. Kim, W. *et al.* Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* **8**, (2019).
174. Effects of High-dose Ionizing Radiation | Biological Effects of Radiation | dentalcare.com. <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce572/effects-of-high-dose-ionizing-radiation>.
175. Weeks, K. J., Litvinenko, V. N. & Madey, J. M. The Compton backscattering process and radiotherapy. *Med. Phys.* **24**, 417–423 (1997).
176. Cannan, W. J., Tsang, B. P., Wallace, S. S. & Pederson, D. S. Nucleosomes Suppress the Formation of Double-strand DNA Breaks during Attempted Base Excision Repair of Clustered Oxidative Damages*. *J. Biol. Chem.* **289**, 19881–19893 (2014).

177. Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. L. & Alexeyev, M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2539–2548 (2009).
178. Leach, J. K., Van Tuyle, G., Lin, P. S., Schmidt-Ullrich, R. & Mikkelsen, R. B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* **61**, 3894–3901 (2001).
179. Kam, W. W.-Y. & Banati, R. B. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 607–619 (2013).
180. Kiwerska, K. & Szyfter, K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J. Appl. Genet.* **60**, 329–334 (2019).
181. Begg, A. C., Stewart, F. A. & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 239–253 (2011).
182. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8241–8246 (2001).
183. Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. & Sharma, R. A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 193–204 (2008).
184. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**, 48–60 (2012).
185. Yamamori, T. *et al.* Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 260–270 (2012).

186. Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S. & Scott, O. C. A. The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **26**, 638–648 (1953).
187. Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M. & De Ridder, M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers* **11**, (2019).
188. Baumann, M. *et al.* Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 234–249 (2016).
189. Zhang, Y. & Martin, S. G. Redox Proteins and Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **26**, 289–300 (2014).
190. Verma, V. Relationship and interactions of curcumin with radiation therapy. *World J. Clin. Oncol.* **7**, 275–283 (2016).
191. Sun, Y., Clair, D. K. S., Xu, Y., Crooks, P. A. & Clair, W. H. S. A NADPH Oxidase–Dependent Redox Signaling Pathway Mediates the Selective Radiosensitization Effect of Parthenolide in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **70**, 2880–2890 (2010).
192. Boivin, A. *et al.* Transient Alteration of Cellular Redox Buffering before Irradiation Triggers Apoptosis in Head and Neck Carcinoma Stem and Non-Stem Cells. *PLOS ONE* **6**, e14558 (2011).
193. Brizel, D. M. *et al.* Phase III Randomized Trial of Amifostine as a Radioprotector in Head and Neck Cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3339–3345 (2000).
194. Todoric, J., Antonucci, L. & Karin, M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **9**, 895–905 (2016).
195. Sohn, S.-H. *et al.* The inflammasome accelerates radiation-induced lung inflammation and fibrosis in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 917–926 (2015).

196. Kan, C. & Zhang, J. BRCA1 Mutation: A Predictive Marker for Radiation Therapy? *Int. J. Radiat. Oncol.* **93**, 281–293 (2015).
197. Morgan, M. A. & Lawrence, T. S. Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 2898–2904 (2015).
198. Ernst, A. *et al.* HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcomas. *Cancer Lett.* **365**, 211–222 (2015).
199. Hümmerich, J. *et al.* Constitutive mRNA expression of DNA repair-related genes as a biomarker for clinical radio-resistance: A pilot study in prostate cancer patients receiving radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 593–604 (2006).
200. Weigel, C., Schmezer, P., Plass, C. & Popanda, O. Epigenetics in radiation-induced fibrosis. *Oncogene* **34**, 2145–2155 (2015).
201. Sharabi, A. B., Lim, M., DeWeese, T. L. & Drake, C. G. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol.* **16**, e498–e509 (2015).
202. Sharma, A. *et al.* Radiotherapy of Human Sarcoma Promotes an Intratumoral Immune Effector Signature. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4843–4853 (2013).
203. Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E. M., Garcia Lora, A. M. & van Hall, T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 44–51 (2016).

204. Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* **203**, 1259–1271 (2006).
205. Golden, E. B., Demaria, S., Schiff, P. B., Chachoua, A. & Formenti, S. C. An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 365–372 (2013).
206. Kang, J., Demaria, S. & Formenti, S. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *J. Immunother. Cancer* **4**, (2016).
207. Tang, L. *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 87 (2018).
208. Maus, F. *et al.* The NG2 Proteoglycan Protects Oligodendrocyte Precursor Cells against Oxidative Stress via Interaction with OMI/HtrA2. *PLOS ONE* **10**, e0137311 (2015).
209. Tamari, Y., Kashino, G. & Mori, H. Acquisition of radioresistance by IL-6 treatment is caused by suppression of oxidative stress derived from mitochondria after γ -irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **58**, 412–420 (2017).
210. Chiou, J.-F. *et al.* Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 1904–1913 (2009).
211. Alphonse, G. *et al.* Overcoming resistance to gamma-rays in squamous carcinoma cells by poly-drug elevation of ceramide levels. *Oncogene* **23**, 2703–2715 (2004).
212. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).

213. Graham, K. & Unger, E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 6049–6058 (2018).
214. Harada, H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **52**, 545–556 (2011).
215. Brurberg, K. G., Graff, B. A., Olsen, D. R. & Rofstad, E. K. Tumor-line specific pO₂ fluctuations in human melanoma xenografts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 403–409 (2004).
216. Kimura, H. *et al.* Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res.* **56**, 5522–5528 (1996).
217. Bayer, C., Shi, K., Astner, S. T., Maftai, C.-A. & Vaupel, P. Acute Versus Chronic Hypoxia: Why a Simplified Classification is Simply Not Enough. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **80**, 965–968 (2011).
218. Jordan, B. F. & Sonveaux, P. Targeting Tumor Perfusion and Oxygenation to Improve the Outcome of Anticancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
219. Dewhirst, M. W. *et al.* Quantification of longitudinal tissue pO₂ gradients in window chamber tumours: impact on tumour hypoxia. *Br. J. Cancer* **79**, 1717–1722 (1999).
220. Dewhirst, M. W. Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress. *Radiat. Res.* **172**, 653–665 (2009).
221. Rofstad, E. K., Gaustad, J.-V., Egeland, T. A. M., Mathiesen, B. & Galappathi, K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int. J. Cancer* **127**, 1535–1546 (2010).

222. Chan, N. *et al.* Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res.* **68**, 605–614 (2008).
223. Luoto, K. R., Kumareswaran, R. & Bristow, R. G. Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability. *Genome Integr.* **4**, 5 (2013).
224. Kondo, A. *et al.* Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **61**, 7603–7607 (2001).
225. Rockwell, S., Dobrucki, I. T., Kim, E. Y., Marrison, S. T. & Vu, V. T. Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. *Curr. Mol. Med.* **9**, 442–458 (2009).
226. Teicher, B. A., Lazo, J. S. & Sartorelli, A. C. Classification of Antineoplastic Agents by their Selective Toxicities toward Oxygenated and Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Res.* **41**, 73–81 (1981).
227. Leone, R. D., Horton, M. R. & Powell, J. D. Something in the Air: Hyperoxic Conditioning of the Tumor Microenvironment for Enhanced Immunotherapy. *Cancer Cell* **27**, 435–436 (2015).
228. Hatfield, S. M. & Sitkovsky, M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1 α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **29**, 90–96 (2016).
229. Phillips, R. M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 441–457 (2016).
230. Cade, I. S. & McEwen, J. B. Clinical trials of radiotherapy in hyperbaric oxygen at Portsmouth, 1964–1976. *Clin. Radiol.* **29**, 333–338 (1978).

231. Thews, O. & Vaupel, P. Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia. *Strahlenther. Onkol.* **191**, 875–882 (2015).
232. Kohshi, K. *et al.* Radiotherapy after hyperbaric oxygenation for malignant gliomas: a pilot study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 676–678 (1996).
233. Poskitt, T. R. Radiation Therapy and the Role of Red Blood Cell Transfusion. *Cancer Invest.* **5**, 231–236 (1987).
234. Pinel, S. *et al.* Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59**, 250–259 (2004).
235. Khandelwal, S. R. *et al.* RSR13, an allosteric effector of haemoglobin, and carbogen radiosensitize FSaII and SCCVII tumours in C3H mice. *Br. J. Cancer* **79**, 814–820 (1999).
236. Suh, J. H. *et al.* Results of the Phase III ENRICH (RT-016) Study of Efavoximal Administered Concurrent with Whole Brain Radiation Therapy (WBRT) in Women with Brain Metastases from Breast Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **72**, S50–S51 (2008).
237. Gainer, J. L., Sheehan, J. P., Larner, J. M. & Jones, D. R. Trans sodium crocetinate with temozolomide and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **126**, 460–466 (2017).
238. Dachs, G. U. *et al.* Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat. Med.* **3**, 515–520 (1997).
239. Liu, J., Harada, H., Ogura, M., Shibata, T. & Hiraoka, M. Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumour xenografts. *Br. J. Cancer* **96**, 1871–1878 (2007).

240. Sonveaux, P. *et al.* Endothelin-1 Is a Critical Mediator of Myogenic Tone in Tumor Arterioles: Implications for Cancer Treatment. *Cancer Res.* **64**, 3209–3214 (2004).
241. Sonveaux, P. *et al.* Modulation of the tumor vasculature functionality by ionizing radiation accounts for tumor radiosensitization and promotes gene delivery. *FASEB J.* **16**, 1979–1981 (2002).
242. Moon, E. J. *et al.* NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20477–20482 (2010).
243. Murayama, C. *et al.* Liposome-Encapsulated Hemoglobin Ameliorates Tumor Hypoxia and Enhances Radiation Therapy to Suppress Tumor Growth in Mice. *Artif. Organs* **36**, 170–177 (2012).
244. Teicher, B. A. *et al.* Oxygenation of tumors by a hemoglobin solution. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120**, 85–90 (1993).
245. Johnson, J. L. H. Oxygen Carriers: Are They Enough for Cellular Support? in *Neuroprotective Therapy for Stroke and Ischemic Disease* (eds. Lapchak, P. A. & Zhang, J. H.) 621–640 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-45345-3_26.
246. Rockwell, S. *et al.* Effects of hyperbaric oxygen and a perfluorooctylbromide emulsion on the radiation responses of tumors and normal tissues in rodents. *Int. J. Radiat. Oncol.* **22**, 87–93 (1992).
247. Rose, C., Lustig, R., McIntosh, N. & Teicher, B. A clinical trial of Fluosol DA 20% in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol.* **12**, 1325–1327 (1986).
248. DEFINITY® Safety Profile. <https://www.definityimaging.com/safety-profile.html>.

249. Zlotecki, R. A., Baxter, L. T., Boucher, Y. & Jain, R. K. Pharmacologic Modification of Tumor Blood Flow and Interstitial Fluid Pressure in a Human Tumor Xenograft : Network Analysis and Mechanistic Interpretation. *Microvasc. Res.* **50**, 429–443 (1995).
250. Wallis, C. J. D. *et al.* Surgery Versus Radiotherapy for Clinically-localized Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur. Urol.* **70**, 21–30 (2016).
251. Movsas, B. *et al.* Hypoxic regions exist in human prostate carcinoma. *Urology* **53**, 11–18 (1999).
252. Milosevic, M. *et al.* Tumor Hypoxia Predicts Biochemical Failure following Radiotherapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2108–2114 (2012).
253. Jing, X. *et al.* Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol. Cancer* **18**, 157 (2019).
254. Sun, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Lett.* **380**, 205–215 (2016).
255. Chaudary, N. & Hill, R. P. Hypoxia and metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1947–1949 (2007).
256. Sonveaux, P. Provascular strategy: Targeting functional adaptations of mature blood vessels in tumors to selectively influence the tumor vascular reactivity and improve cancer treatment. *Radiother. Oncol.* **86**, 300–313 (2008).
257. Zhang, M., Zhou, Z., Zhao, Z. & Garrison, J. Targeting Tumor Hypoxia in Radiotherapy: A Brief Review of Historical Background and Recent Progress. *Explor. Res. Hypothesis Med.* **1**, 17–28 (2016).

258. Rofstad, E. K., Galappathi, K., Mathiesen, B. & Ruud, E.-B. M. Fluctuating and diffusion-limited hypoxia in hypoxia-induced metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1971–1978 (2007).
259. Yu, G. Z. *et al.* Ultrasound-Targeted Microbubble Cavitation with Sodium Nitrite Synergistically Enhances Nitric Oxide Production and Microvascular Perfusion. *Ultrasound Med. Biol.* **46**, 667–678 (2020).
260. Tozer, G. M. *et al.* Reduced capacity of tumour blood vessels to produce endothelium-derived relaxing factor: significance for blood flow modification. *Br. J. Cancer* **74**, 1955–1960 (1996).
261. Maeda, H. Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the EPR effect. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **142**, 296–298 (2010).
262. Bailey, K. M. *et al.* Evaluation of the “Steal” Phenomenon on the Efficacy of Hypoxia Activated Prodrug TH-302 in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* **9**, e113586 (2014).
263. Horsman, M. R., Nordmark, M., Høyer, M. & Overgaard, J. Direct evidence that hydralazine can induce hypoxia in both transplanted and spontaneous murine tumours. *Br. J. Cancer* **72**, 1474–1478 (1995).
264. Kooiman, K. *et al.* Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery. *Ultrasound Med. Biol.* **46**, 1296–1325 (2020).
265. McNabb, E. *et al.* Ultrasound-stimulated microbubble radiation enhancement of tumors: Single-dose and fractionated treatment evaluation. *PLOS ONE* **15**, e0239456 (2020).

266. Czarnota, D. G. *Novel MRI-Guided Ultrasound Stimulated Microbubble Radiation Treatment for Patients With Chest-wall and Locally-Advanced Breast Cancer*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04431674> (2020).
267. Todorova, M. *et al.* Antitumor effects of combining metronomic chemotherapy with the antivasular action of ultrasound stimulated microbubbles. *Int. J. Cancer* **132**, 2956–2966 (2013).
268. Shaked, Y. *et al.* Therapy-Induced Acute Recruitment of Circulating Endothelial Progenitor Cells to Tumors. *Science* **313**, 1785–1787 (2006).
269. Belcik, J. T. *et al.* Augmentation of Muscle Blood Flow by Ultrasound Cavitation Is Mediated by ATP and Purinergic Signaling. *Circulation* **135**, 1240–1252 (2017).
270. Sonveaux, P. *et al.* Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway: implications for tumor radiotherapy. *Cancer Res.* **63**, 1012–1019 (2003).
271. Malaquin, N. *et al.* DNA Damage- But Not Enzalutamide-Induced Senescence in Prostate Cancer Promotes Senolytic Bcl-xL Inhibitor Sensitivity. *Cells* **9**, E1593 (2020).
272. Wei, K. *et al.* Quantification of Myocardial Blood Flow With Ultrasound-Induced Destruction of Microbubbles Administered as a Constant Venous Infusion. *Circulation* **97**, 473–483 (1998).
273. Russell, J. *et al.* Immunohistochemical Detection of Changes in Tumor Hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **73**, 1177–1186 (2009).
274. Kaanders, J. H. A. M. *et al.* Pimonidazole Binding and Tumor Vascularity Predict for Treatment Outcome in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* **62**, 7066–7074 (2002).

275. Masaki, Y. *et al.* Imaging Mass Spectrometry Revealed the Accumulation Characteristics of the 2-Nitroimidazole-Based Agent 'Pimonidazole' in Hypoxia. *PloS One* **11**, e0161639 (2016).
276. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732 (2003).
277. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
278. Ghosh Dastidar, D., Ghosh, D. & Chakrabarti, G. Tumour vasculature targeted anti-cancer therapy. *Vessel Plus* **4**, (2020).
279. Siemann, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* **37**, 63–74 (2011).
280. Rajendran, P. *et al.* The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 1057–1069 (2013).
281. Belcik, J. T. *et al.* Augmentation of Limb Perfusion and Reversal of Tissue Ischemia Produced by Ultrasound-Mediated Microbubble Cavitation. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **8**, (2015).
282. Padera, T. P. *et al.* Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* **427**, 695 (2004).
283. Forster, J. C., Harriss-Phillips, W. M., Douglass, M. J. & Bezak, E. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia* **5**, 21–32 (2017).
284. Goldacre, R. J. & Sylvén, B. On the Access of Blood-Borne Dyes to Various Tumour Regions. *Br. J. Cancer* **16**, 306–322 (1962).

285. Tozer, G. M., Lewis, S., Michalowski, A. & Aber, V. The relationship between regional variations in blood flow and histology in a transplanted rat fibrosarcoma. *Br. J. Cancer* **61**, 250–257 (1990).
286. Chan, R. C., Babbs, C. F., Vetter, R. J. & Lamar, C. H. Abnormal Response of Tumor Vasculature to Vasoactive Drugs²³. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **72**, 145–150 (1984).
287. Klein, D. The Tumor Vascular Endothelium as Decision Maker in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **8**, 367 (2018).
288. Tilki, D. *et al.* Zone-specific remodeling of tumor blood vessels affects tumor growth. *Cancer* **110**, 2347–2362 (2007).
289. Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E. & Vacca, A. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett.* **248**, 18–23 (2007).
290. Peterson, H. I. Modification of tumour blood flow--a review. *Int. J. Radiat. Biol.* **60**, 201–210 (1991).
291. Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K. & Berry, C. Adenosine: Physiology, Pharmacology, and Clinical Applications. *JACC Cardiovasc. Interv.* **7**, 581–591 (2014).
292. Leone, R. D. & Emens, L. A. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **6**, 57 (2018).
293. Amate, M., Goldgewicht, J., Sellamuthu, B., Stagg, J. & Yu, F. T. H. The effect of ultrasound pulse length on microbubble cavitation induced antibody accumulation and distribution in a mouse model of breast cancer. *Nanotheranostics* **4**, 256–269 (2020).

294. Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5379–5388 (2009).
295. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. & Yeoh, K.-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 193–199 (2012).
296. Mehta, S., Suhag, V., Semwal, M. & Sharma, N. Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Med. J. Armed Forces India* **66**, 158–162 (2010).