



HAL
open science

Pharmacologie des antiangiogéniques : effet sur les propriétés élastiques des grosses artères

Maureen Alivon

► **To cite this version:**

Maureen Alivon. Pharmacologie des antiangiogéniques : effet sur les propriétés élastiques des grosses artères. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P609 . tel-01126854

HAL Id: tel-01126854

<https://theses.hal.science/tel-01126854>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Imagerie

Doctorat de sciences

2011-2014

**Pharmacologie des antiangiogéniques : effet sur les propriétés élastiques
des grosses artères**

Thèse Présentée par

Maureen ALIVON

Dirigée par

Pr Pierre BOUTOUYRIE

Soutenue publiquement le jeudi 11 Septembre 2014

Membres du Jury:

- Dr Patrick Lacolley (Rapporteur)
- Pr Jean-Luc Cracowski (Rapporteur)
- Pr Pierre Boutouyrie (directeur de thèse)
- Pr Stéphane Laurent (Examineur)
- Pr Bernard Levy (Examineur)
- Pr François Goldwasser (Examineur)
- Dr Robinson Joannides (Examineur)
- Dr Gilles Chironi (Examineur)

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Professeur Pierre Boutouyrie et au Professeur Stéphane Laurent pour m'avoir accueillie dans leur équipe et m'avoir permis de m'épanouir dans ce travail de recherche. Merci pour votre pédagogie, vos conseils et votre soutien.

Je remercie également nos partenaires de l'hôpital Cochin, en particulier le Dr Julie Giroux qui a initié ce travail, le Professeur François Goldwasser, Benoît Blanchet et le professeur Michel Vidal qui se sont intéressés de près à ce travail et ont beaucoup contribué à la compréhension des résultats.

Je tiens à remercier mes collègues et toutes les personnes qui ont effectué des stages au sein de l'équipe pendant ces cinq dernières années. Un grand merci à Erwan qui m'a formée aux mesures artérielles, à Louise pour son aide dans la partie biomécanique, à Nicolas et Damien pour nos grands moments de rigolade, à Magalie qui me tient compagnie le mercredi, aux internes de médecine et aux étudiants de master qui se sont succédé et à notre super ancienne secrétaire Laurence.

Un grand merci au Dr Matthieu Monge pour m'avoir initiée à la médecine, et m'avoir soutenue dans cette dernière année de thèse pleine de rebondissements.

Merci à nos collaborateurs hollandais Koen Reesink, Anouk de Lepper, Richard Lopata, Renate Boekhoven et Peter Brands pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci au personnel, aux étudiants et aux chercheurs du centre de recherche cardiovasculaire de Paris (PARCC) qui offre un cadre idéal pour une recherche de qualité.

Dernier grand MERCI à ma famille, en particulier mes parents, à mes proches et amis qui m'ont soutenue dans mes choix et qui ont cru en moi.

Pour finir je souhaite remercier mes rapporteurs et les autres membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

RESUME

Les antiangiogéniques (AAD) représentent une classe relativement récente d'anticancéreux indiqués dans un nombre croissant de cancers solides avancés. Ces traitements inhibent la voie du VEGF en amont avec le bevacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF et en aval avec les inhibiteurs des tyrosines kinases des récepteurs impliqués dans cette voie de signalisation (sorafenib et sunitinib). Les AAD s'accompagnent d'effets secondaires dont le plus fréquent est l'hypertension artérielle. Ma thèse a pour objectif de mieux comprendre la physiopathologie de l'hypertension artérielle iatrogène induite par les AAD, notamment en mesurant l'effet des AAD sur les grosses artères. Le deuxième objectif est de déterminer des marqueurs précoces d'efficacité et d'optimisation de ces traitements, notamment avec un suivi thérapeutique pharmacologique (STP). Pour remplir ces objectifs nous avons mis en place une étude clinique prospective, observationnelle monocentrique dans laquelle nous avons suivi l'évolution de paramètres artériels au cours du traitement AAD avec des techniques non-invasives chez des patients traités par AAD.

Dans un premier travail nous avons montré qu'il y avait une augmentation précoce et cliniquement significative de la pression brachiale et centrale et de la rigidité artérielle et du diamètre carotidien, sous AAD et que ces modifications étaient en partie indépendantes de la pression artérielle. Nous avons également montré que la présence d'ondes de réflexion amples et d'une rigidité aortique basse de base avant l'introduction des AAD prédisaient une augmentation de pression artérielle systolique (PAS) à un stade précoce d'exposition (coefficients de régression : 0.37[0.04-0.70] et -1.27[-2.43 ; -0.11], $p < 0.05$ respectivement) alors qu'après une exposition chronique aux AAD, seule une rigidité artérielle basse de base prédisait une augmentation de la PAS (-2.46 [-4.02 ; -0.90], $p < 0.01$). L'atteinte des grosses artères est positivement associée à l'évolution carcinologique. En effet une augmentation précoce de la rigidité aortique et carotidienne sous AAD étaient associées à un haut risque de progression (RR : 1.24 [1.01 ; 1.51], $p = 0.042$ et 1.34 [1.03-1.73], $p = 0.027$ respectivement).

Dans la deuxième partie, nous avons montré à l'aide d'un modèle pharmacocinétique de population, que l'atteinte artérielle observée lors de la prise d'AAD était due à un effet pharmacologique des AAD sur les grosses artères indépendamment de l'augmentation de pression induite par les AAD. L'augmentation de rigidité artérielle était proportionnelle à la concentration plasmatique d'AAD et à l'augmentation de la pression artérielle (coefficient de corrélation standardisé : 0.43 et 0.38, $p < 0.01$, respectivement), expliquant respectivement 19% et 15% de la variance. Nous avons également montré que la progression du cancer était moindre chez les patients les plus exposés aux AAD (RR : 0.60 [0.38 ; 0.97], $p = 0.035$) et enfin, nous avons pu déterminer une concentration sérique cible qui permettra aux cliniciens d'avoir un objectif à atteindre pour optimiser l'efficacité des AAD.

En conclusion, nous avons pu démontrer l'existence d'une atteinte précoce des grosses artères se traduisant par une augmentation de la rigidité artérielle et un remodelage carotidien sous traitement AAD. Cette atteinte artérielle est directement liée à un effet pharmacologique des AAD de manière indépendante de l'augmentation de pression induite par ces traitements. Nous avons montré que les altérations de la paroi artérielle ainsi que le suivi thérapeutique pharmacologique prédisaient le pronostic carcinologique. Le suivi des propriétés artérielles combinée au STP des AAD pourraient optimiser les chances d'efficacité de ces traitements.

Sommaire

TABLE DES TABLEAUX	7
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	9
ETAT DES CONNAISSANCES	12
1. Néo-angiogénèse chez l'adulte: cas du cancer	12
1.1 Les principaux facteurs inducteurs de l'angiogénèse tumorale	13
1.2 Les principaux facteurs inhibiteurs de l'angiogénèse tumorale	14
1.3 La Voie du VEGF.....	15
1.4 Swith angiogénique et propriétés des vaisseaux tumoraux	16
2. Propriétés pharmacologiques et indications thérapeutiques des antiangiogéniques étudiés	20
2.1 Propriétés pharmacologiques du bevacizumab.....	21
2.2 Propriétés pharmacologiques du sunitinib.....	22
2.3 Propriétés pharmacologiques du sorafenib.....	25
1.4. Suivi thérapeutique pharmacologique des antiangiogéniques	26
3. Atteintes cardiovasculaires et rénales des antiangiogéniques	27
3.1 L'hypertension artérielle	27
3.2 Les atteintes cardiovasculaires	28
3.3 Les atteintes rénales.....	28
4. Physiopathologie et prise en charge de l'hypertension induite par les AAD	28
4.1 Caractéristiques de l'hypertension induite par les AAD	28
4.2 Mécanismes physiopathologiques de l'hypertension induite par les AAD	29
4.3 Prise en charge de l'hypertension induite par les AAD.....	29
5. Marqueurs précoces d'efficacité des AAD.....	31
6. La rigidité artérielle	32
6.1 Structure et composition des grosses artères	33
6.2 Déterminants de la rigidité artérielle des grosses artères.....	35
6.3 Vitesse de propagation de l'onde pouls.....	36
6.4 Les ondes de réflexion.....	38
PROBLEMATIQUE	41
Hypothèses de travail	42
Objectifs	42
Présentation des articles	42
MATERIEL ET METHODES	43
1. Protocole de l'étude clinique prospective observationnelle	44

2.	La tonométrie d'aplanation (SphygmoCor®).....	45
2.1	Principe de la tonométrie d'aplanation.....	45
2.2	Estimation des pressions artérielles centrales.....	46
2.3	Quantification des ondes de réflexion.....	47
2.4	Mesure de la rigidité aortique.....	47
3.	Echotracking à haute résolution (Artlab®).....	49
3.1	Principe de la technique d'échotracking.....	49
3.2	Evaluation des propriétés élastiques de l'artère carotide commune.....	49
3.3	Mesure de la déformation de la paroi au cours du cycle cardiaque.....	50
4.	Validation de l'appareil Arteriograph® pour la mesure de la rigidité aortique.....	55
5.	Scanner laser doppler des vaisseaux de la rétine (Heidelberg Retinal Flowmeter®).....	86
6.	Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Dionex Ultimate 300®).....	87
6.1	Prélèvements.....	87
6.2	Dosage plasmatique du sorafenib et du sunitinib.....	88
	TRAVAUX DE THESE.....	90
	I. ROLE DES GROSSES ARTERES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION INDUITE PAR LES ANTIANGIOGENIQUES ET LEUR ASSOCIATION AVEC LE PRONISTIQUE CARCINOLOGIQUE.	90
	II. RELATIONS ENTRE L'ATTEINTE ARTERIELLE, L'EXPOSITION AUX ANTIANGIOGENIQUES ET LEUR EFFICACITE: UN MODELE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION.....	120
	DISCUSSION.....	155
1.	Modifications des propriétés mécaniques des grosses artères sous traitement AAD.....	155
2.	Influence de l'état des petites et grosses artères avant l'introduction du traitement sur l'augmentation de pression induite par les AAD.....	159
3.	Relation entre l'augmentation précoce de la rigidité artérielle sous AAD et la progression tumorale.....	161
4.	Relation entre l'exposition aux AAD et l'augmentation de rigidité artérielle.....	163
5.	Relations entre l'exposition aux AAD, la progression et la mortalité liées au cancer.....	165
6.	Relations entre l'atteinte artérielle, l'exposition aux AAD et la progression tumorale.....	167
	PERSPECTIVES.....	169
	CONCLUSION.....	171
	BIBLIOGRAPHIE.....	174

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Déséquilibre entre les facteurs anti/pro angiogéniques en faveur des facteurs pro-angiogéniques dans le cancer.

Figure 2. Voies de signalisation des VEGFs

Figure 3. Hypoxie et angiogénèse

Figure 4. Aspect normal et anormale de la vascularisation en microscopie électronique à balayage

Figure 5. Perméabilité des vaisseaux tumoraux (22) Ravaud Progrès en urologie 2007

Figure 6. Cibles du sorafenib, sunitinib et bevacizumab

Figure 7. Compliance de l'aorte au cours du cycle cardiaque

Figure 8. Structure en trois feuillets de la paroi des

Figure 9. Représentation schématique de la structure pariétale de la média entre deux lames élastiques

Figure 10. Structure organisée de la media d'une artère élastique. Connections entre les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire.

Figure 11. Physiopathologie de l'augmentation de pression et de la rigidité artérielle

Figure 12. Valeurs de référence de la VOP en fonction de l'âge et de la pression artérielle

Figure 13. Risque d'évènement coronarien en fonction de la VOP et du score de Framingham

Figure 14. Représentation graphique de l'effet des ondes de réflexion sur la pression centrale.

Figure 15. Représentation du phénomène d'amplification chez le sujet jeune avec des artères distensibles qui s'estompe avec l'âge et la rigidité des artères.

Figure 16. Schéma de l'étude clinique longitudinale

Figure 17. Principe de la tonométrie d'aplanation

Figure 18. Représentation graphique du calcul des pressions centrales à partir des courbes de pressions au niveau de l'artère radiale par tonométrie d'aplanation

Figure 19. Représentation graphique de l'augmentation de pression générée par le retour précoce des ondes de réflexion

Figure 20. Mesure de la vitesse de l'onde de pouls carotido-fémorale (VOP-CF) par la méthode « foot-to-foot »

Figure 21. Représentation graphique de la mesure de la VOP carotido-fémorale.

Figure 22. Images échographiques de l'artère carotide commune

Figure 23. Délimitation de la paroi antérieure et postérieure luminale de l'ACC par le filtre SAF.

Figure 24. Délimitation de la paroi antérieure et postérieure par le filtre SAF.

Figure 25. Fenêtre 2D composée de plusieurs lignes de signal radiofréquence avec des points définis qui seront pistés image après image pour la mesure du déplacement.

Figure 26. Représentation graphique du strain à un temps t du cycle cardiaque. Le jaune représentant la déformation compressive et le rouge ou violet la déformation extensive.

Figure 27. Comparaison entre la rigidité carotidienne et la mesure de rigidité mesurée avec l'Artériographe dans une population de 50 à 75 ans.

Figure 28. Analyse de la paroi des arterioles de la rétine avec le logiciel AFFPIA.

Figure 29. Evolution des concentrations plasmatiques de sorafenib sur 12 heures chez des patients traités par sorafenib (800mg/j).

Figure 30. Chromatogrammes de patients traités par sorafenib ou sunitinib.

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des vaisseaux normaux et des vaisseaux tumoraux

Tableau 2. Critères définissant les grades de l'hypertension artérielle selon la CTCAE et l'ESH/ESC

ABREVIATIONS

AAD : antiangiogéniques

AIx : index d'augmentation aortique

AIx@75 : index d'augmentation aortique normalisé à une fréquence cardiaque de 75 bpm

Cmax : concentration plasmatique maximale

CML : cellule musculaire lisse

CV : cardiovasculaire

FC : fréquence cardiaque

FDR : Facteur de risque

GIST : tumeur stromale gastro-intestinale

HTA : hypertension artérielle

INCa : Institut National du Cancer

IMT : épaisseur intima-media

ITK : inhibiteur des tyrosines kinases

MEC : matrice extracellulaire

NO : oxyde nitrique

PASb : pression artérielle systolique brachiale

PASc : pression artérielle systolique centrale

PADb : pression artérielle diastolique brachiale

PADc : pression artérielle diastolique centrale

PAMb : pression artérielle moyenne brachiale

PPc : pression pulsée centrale

VEGF : vascular endothelium growth factor

VOP : vitesse de l'onde de pouls

INTRODUCTION

Le cancer est la première cause de mortalité en France devant de peu les maladies cardiovasculaires, responsable de plus de 148 000 décès par an en 2012, selon l'institut national du cancer (INCa).

Le cancer est caractérisé par une prolifération anormale, non régulée des cellules au sein d'un tissu sain. Les cellules tumorales perdent l'inhibition de contact, se divisent indéfiniment et perdent toute adhérence entre elles, rendant leur migration possible et formant ainsi les métastases.

La lutte contre les lésions cancéreuses avérées comportait classiquement des traitements visant à détruire les cellules cancéreuses (chirurgie, radiothérapie, médicaments cytotoxiques), des médicaments renforçant les défenses immunitaires et des inhibiteurs de la prolifération cellulaire plus ou moins spécifiques. Parmi ce vaste attirail thérapeutique, une classe d'anticancéreux relativement récente est en plein essor depuis la fin des années 2000 : ce sont les antiangiogéniques. Ceux-ci se distinguent des approches précédentes en ce qu'ils ciblent la microcirculation tumorale via la voie de signalisation du VEGF dans le but d'affamer la tumeur en inhibant l'angiogénèse tumorale responsable du développement et de la dissémination des tumeurs solides.

Cette nouvelle classe de médicaments est une avancée majeure, cependant, ils ne sont pas dénués d'effets indésirables dont le plus fréquent est l'hypertension artérielle iatrogène présente chez plus de 30% des patients. La physiopathologie de l'hypertension induite par les antiangiogéniques n'est pas encore tout à fait établie. Elle pourrait impliquer l'action directe des AAD entraînant une atteinte de la microcirculation, au travers d'une raréfaction capillaire, d'une diminution de la production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales et d'un remodelage des petits vaisseaux. Cependant, ces altérations ne suffisent très certainement pas expliquer à elles seules cette augmentation de pression si rapide.

L'hypertension artérielle est connue pour être un facteur de risque majeur des pathologies coronarienne, cérébrale et rénale. Le cancer touche toutes les catégories d'âge de patients présentant ou non des facteurs de risque cardiovasculaires. De plus, avec les progrès de la prise en charge et les nouvelles molécules efficaces arrivant sur le marché, l'espérance de vie des patients augmente peu à peu. Il est donc important de bien comprendre les effets indésirables de cette classe d'anticancéreux, en l'occurrence ici la physiopathologie de l'hypertension et l'atteinte vasculaire induite par les AAD, afin de détecter en amont les

patients à risque. Il est également important de trouver les traitements adéquats pour le traitement de l'hypertension iatrogène dans le contexte du cancer. A l'heure actuelle il n'y a pas de biomarqueur précoce d'efficacité des AAD, certaines pistes sont pourtant bien avancées. L'hypertension induite par les AAD pourrait constituer un marqueur de l'efficacité tissulaire de ces traitements. Elle a été associée dans de nombreuses études à une meilleure survie, de même que certains polymorphismes de gènes impliqués dans l'angiogénèse. Dans cette thèse, nous faisons l'hypothèse que les propriétés artérielles avant l'introduction des AAD ainsi que les modifications de ces propriétés artérielles en cours de traitement pourraient être associées à la réponse carcinologique à cette classe pharmacologique. Parmi les biomarqueurs structuraux investigués ces dernières années, l'augmentation de la rigidité aortique estimée par la vitesse de propagation de l'onde de pouls (VOP) le long de l'aorte thoraco-abdominale est un marqueur de risque cardiovasculaire dans de toutes les populations étudiées à ce jour. La VOP prédit le risque de mortalité, morbidité et permet de reclasser efficacement le risque cardiovasculaire des patients. L'hypertension artérielle et le vieillissement sont les deux principaux déterminants de l'augmentation de rigidité. La rigidité est un des déterminants de la réflexion des ondes de pression, estimée en clinique par l'index d'augmentation (AIx). L'autre déterminant étant l'état tonique des petites artères périphériques. Ceci fait de la VOP et de l'AIx des candidats importants comme marqueur d'efficacité tissulaires des AAD.

Dans cette thèse nous présenterons les grands axes de notre recherche portant sur l'effet des antiangiogéniques sur les propriétés élastiques des grosses artères dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de l'hypertension artérielle induite par cette classe d'anticancéreux et d'évaluer leurs effets sur la survie liée au cancer. Dans un premier temps nous ferons le tour des connaissances concernant l'angiogénèse tumorale et la voie du VEGF, les mécanismes d'action des médicaments étudiés, les principaux effets indésirables liés à la prise de ces traitements et la rigidité artérielle. Ensuite nous présenterons les paramètres artériels étudiés et les techniques de mesures utilisées dans au cours de ce travail.

Le premier travail original de cette thèse portera sur l'évolution de la pression artérielle et des paramètres de rigidité et de remodelage artériels après traitements antiangiogénique, et la découverte potentielle d'un marqueur artériel précoce de réponse aux AAD. Dans un deuxième volet nous démontrerons que l'atteinte artérielle est directement liée à la prise d'AAD indépendamment de l'augmentation de pression à l'aide d'un modèle de pharmacocinétique de population et qu'une bonne exposition aux AAD est associée à une

meilleure survie. Enfin nous proposerons un mécanisme expliquant la relation entre l'atteinte artérielle, l'exposition aux AAD et la progression tumorale.

Pour conclure nous synthétiserons les résultats obtenus au cours de ces travaux et les perspectives qui en découlent.

ETAT DES CONNAISSANCES

1. Néo-angiogénèse chez l'adulte: cas du cancer

En 1971 Judah Folkman émet l'hypothèse que la tumeur a besoin de nutriments et d'oxygène fournis par les vaisseaux sanguins pour croître, se multiplier et essaimer. Il en résulterait une néo-angiogénèse induite par des substances diffusibles provenant de la tumeur. **(1)**

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus majoritaire lors du développement vasculaire durant la période embryonnaire est également retrouvé chez l'adulte en condition physiologique lors de la transformation de l'endomètre au cours du cycle menstruel et la réparation tissulaire, mais également en condition pathologique lors de la phase d'expansion d'un cancer, et dans les pathologies inflammatoires, ischémiques, infectieuses et immunologiques.

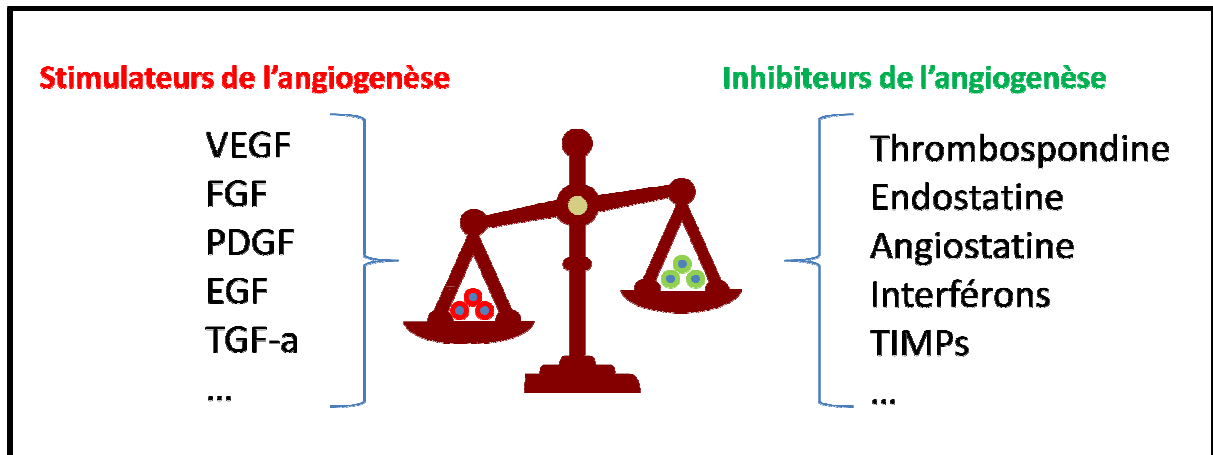
Deux grands mécanismes d'angiogénèse sont décrits :

- Par bourgeonnement
- Par intussusception, c'est-à dire par division d'un vaisseau préexistant.

L'état du réseau vasculaire fait intervenir une balance entre les facteurs pro-angiogéniques et antiangiogéniques conduisant à une stimulation de l'angiogénèse ou au contraire à une stabilisation voir une réduction de l'angiogénèse. Dans le cas des cancers, il y a un déséquilibre de cette balance par surexpression des facteurs pro-angiogéniques et inhibition des facteurs antiangiogéniques. **(Fig 1)**

L'angiogénèse tumorale est différente selon les tumeurs : certaines tumeurs agressives peuvent être peu vascularisées, alors que d'autres tumeurs peu agressives cliniquement peuvent au contraire être très vascularisées. Cela résulterait d'une régulation de l'angiogénèse par les cellules tumorales elles-mêmes et du microenvironnement constitué de cellules immunitaires, de cellules musculaires et des cellules stromales. **(2,3)**

Figure 1. Déséquilibre entre les facteurs anti/pro angiogéniques en faveur des facteurs pro-angiogéniques dans le cancer.



1.1 Les principaux facteurs inducteurs de l'angiogénèse tumorale

Vascular endothelium growth factor (VEGF-A)

C'est le facteur pro-angiogénique le plus important de l'angiogénèse physiologique et pathologique, qui active la voie de signalisation par fixation à ses récepteurs (VEGFR 1 et 2) et induit une augmentation de la perméabilité vasculaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. (4,5)

Fibroblast growth factors (FGF)

Famille de 23 membres parmi lesquels FGF-1 et 2 possèdent des propriétés angiogéniques. Ces deux molécules fixent 4 récepteurs à tyrosine kinase FGFR1-4, et activent les voies de signalisations induisant une prolifération des cellules endothéliales et une migration cellulaire par voie autocrine. (4,5)

Les Angiopoïétines (Ang)

Les angiopoïétines sont exprimées par des cellules non endothéliales. Ang-1 via son récepteur Tie-2 (qui est lui exprimé par les cellules endothéliales) stabilise les vaisseaux en modifiant les jonctions entre les cellules endothéliales et favorise le recrutement des péricytes, alors qu'à l'opposé, Ang-2, antagoniste d'Ang-1 sur Tie-2 déstabilise les vaisseaux. Cependant Ang-2 joue un rôle primordial dans l'angiogénèse tumorale lors de la phase de déstabilisation des vaisseaux préexistants pour favoriser le bourgeonnement des nouveaux vaisseaux tumoraux. (4,5)

Transforming growth factor (TGF- β)

Dans un contexte physiologique, le TGF- β met fin au cycle cellulaire et stoppe la prolifération et la différenciation induisant l'apoptose des cellules endothéliales, entre autres. Dans le cas du cancer, lorsqu'une cellule est transformée en cellule tumorale, des parties du TGF- β sont mutées. Ce TGF- β muté agit sur les cellules stromales environnantes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules musculaires stimulant à l'inverse l'angiogénèse et l'immunosuppression, et rendant ainsi la tumeur invasive. **(6)**

Endocrine gland VEGF (EG-VEGF)

Récemment identifié EG-VEGF est un facteur de croissance vasculaire des organes du système endocrine. Les récepteurs d'EG-VEGF sont ceux de la prokinéticine (PKR 1 et 2). EG-VEGF agirait sur les gènes de la famille MMP (Matrix metalloproteinases) via le récepteurs PKR-2 et intensifierait la capacité d'invasion des cellules tumorales des tumeurs endocriniennes. **(7)**

1.2 Les principaux facteurs inhibiteurs de l'angiogénèse tumorale

Dans le cas du cancer, il y a une répression des facteurs régulant l'angiogénèse. Parmi les plus connus nous retrouvons :

Les Thrombospondines (Tsp)

Ce sont des glycoprotéines ; Tsp-1 inhibe l'angiogénèse tumorale grâce à des effets directs sur la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales et indirects sur la mobilisation des facteurs pro-angiogéniques. La Tsp-2 contrôle la vascularisation des organes et semble participer à un mécanisme de défense anti-tumoral. **(8,9)**

L'angiostatine

C'est un fragment du plasminogène, il a une action au niveau de l'endothélium en inhibant la prolifération des cellules endothéliales et jouerait un rôle dans la latence des métastases. **(10,11)**

L'endostatine

Molécule correspondant au fragment C-terminal du collagène de type XVIII, c'est un inhibiteur spécifique de la prolifération des cellules endothéliales. **(12)** Administré chez des souris porteuse de tumeur il a été montré qu'il y avait une régression de la tumeur à une très petite taille et un maintien de la quiescence tant que l'endostatine était administrée. **(13)**

Le fragment hémopexine (PEX)

Constitue l'extrémité C-terminale de la métalloprotéase MMP2. Il aurait comme effet une inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire et une inhibition de la migration cellulaire.

Le facteur plaquettaire-4 (PF-4)

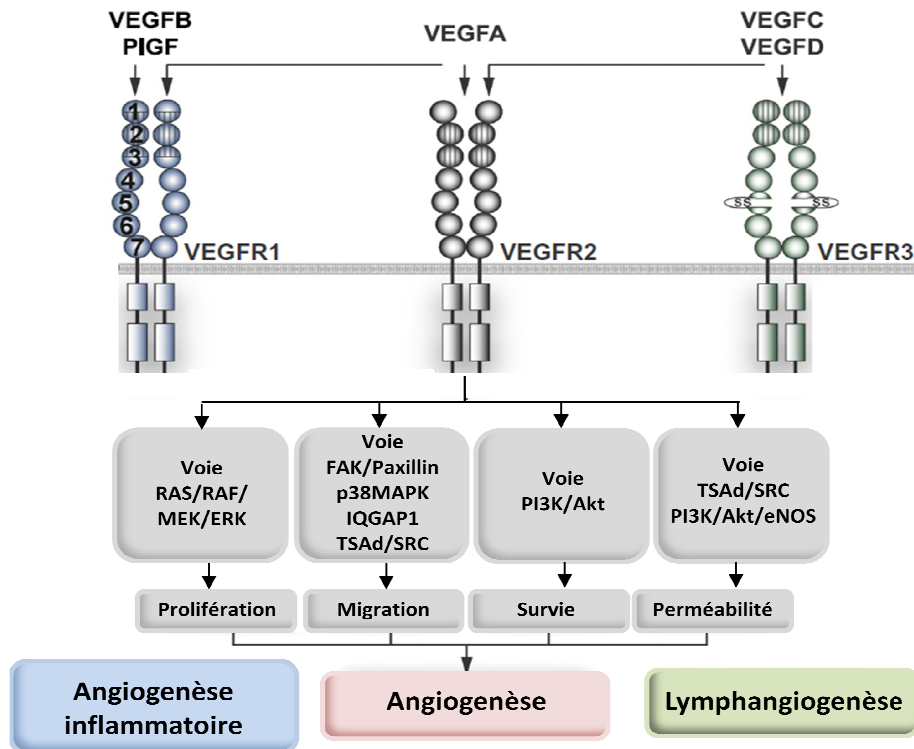
C'est un polypeptide produit par les plaquettes, il inhibe la liaison du FGF et VEGF à leurs récepteurs et la signalisation qui en découle.

1.3 La Voie du VEGF

La voie du VEGF est la principale voie de signalisation impliquée dans le processus d'angiogénèse tumorale. Au moins 7 glycoprotéines de la famille VEGF sont connues : VEGF-A, B, C, D, E, F et de PlGF. Ces protéines ont différents effets sur les cellules endothéliales, macrophages, cellules musculaires lisses via 3 récepteurs à tyrosine kinase: VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. VEGF-A est la plus étudiée du fait de son rôle important dans la formation et l'homéostasie des vaisseaux et dans la néo-vascularisation dans l'athérosclérose. **(14)** VEGF-A fixe préférentiellement VEGFR-2 principalement exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires, les progéniteurs endothéliaux et les cellules hématopoïétiques.

La principale fonction de VEGFA est la régulation de la perméabilité vasculaire, qui est essentielle à l'homéostasie des tissus vasculaires normaux. Dans le cas du cancer, la dérégulation de la voie VEGFA-VEGFR2 entraîne un affinement des membranes basales des vaisseaux les rendant ainsi plus perméables, traduit cliniquement par la présence d'œdèmes. **(15)** Les autres effets biologiques de la signalisation résultant de la fixation de VEGFA à son récepteur VEGFR2 est la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales lors de la formation des néo-vaisseaux. **(16) (Fig 2)** VEGFA/VEGFR2 induit également une vasodilatation via la production d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales. **(17)** L'expression de VEGF-A est régulée par l'hypoxie, les médiateurs inflammatoires (cytokines), et des facteurs de croissances tels que PlGF, IGF-1, IL-1, PDGF- β et TNF- α .

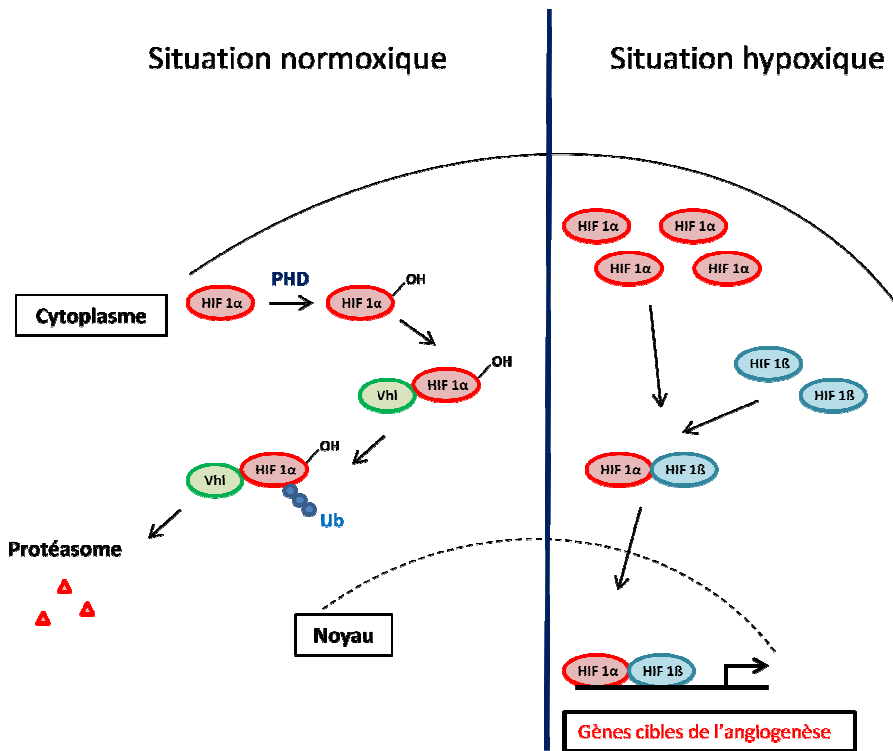
Figure 2 Voies de signalisation des VEGFs



1.4 Switch angiogénique et propriétés des vaisseaux tumoraux

L'angiogenèse tumorale caractérise le passage entre la phase de latence et la phase invasive et métastatique. Cette transition s'accompagne d'un changement phénotypique des vaisseaux appelé le « switch angiogénique » (18). L'hypoxie est un facteur essentiel à la régulation du switch angiogénique, il induit l'expression du VEGF-A et inhibe l'expression de la Thrombospondine 2 qui participe à la quiescence de l'endothélium, c'est un puissant activateur de l'angiogenèse. Le mécanisme de la régulation de l'angiogenèse est décrit dans la **figure 3** : en situation normoxique, c'est-à-dire en présence d'oxygène moléculaire, l'enzyme prolyl 4-hydroxylase (PHD), fixe l'oxygène à HIF1 α . Ensuite une protéine appelée von Hippel-Lindau (Vhl) lie HIF1 α oxydée et le complexe est ubiquitinylé pour être dégradé par le protéasome. Au contraire, quand la quantité d'oxygène diminue jusqu'à atteindre des conditions hypoxiques, la protéine HIF1 α s'accumule dans le cytoplasme, se complexe avec la sous-unité HIF1 β . Le complexe est transloqué dans le noyau et agit comme facteur de transcription en activant les gènes impliqués dans l'angiogenèse.

Figure 3 Hypoxie et angiogénèse



Les vaisseaux qui résultent de cette angiogénèse tumorale ont des propriétés différentes des autres vaisseaux préexistants. Les vaisseaux tumoraux sont profondément anormaux, désorganisés, de distribution anarchique, perméables, fragiles (**figure 4 et 5**). Leur couverture péricytaire est faible, il en résulte une augmentation de la pression interstitielle au sein de la tumeur ce qui favorise la dissémination des métastases mais également défavorise l'accès des chimiothérapies au sein de la tumeur (**Tableau 1**). (18) Les vaisseaux tumoraux sont le siège d'un remodelage important, et ont une spécificité artérielle : les cellules endothéliales expriment les marqueurs Notch 4, DLL4 et Ephrine B2 qui sont normalement présents sur les cellules endothéliales artérielles (19,20). Ce remodelage des vaisseaux tumoraux induit des modifications de flux, qui précéderaient la phase métastatique. (21)

Figure 4 Aspect normal et anormale de la vascularisation en microscopie électronique à balayage (22)

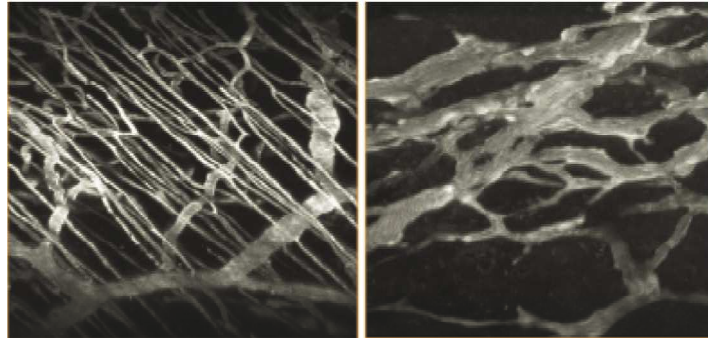


Figure 5 Perméabilité des vaisseaux tumoraux (22)

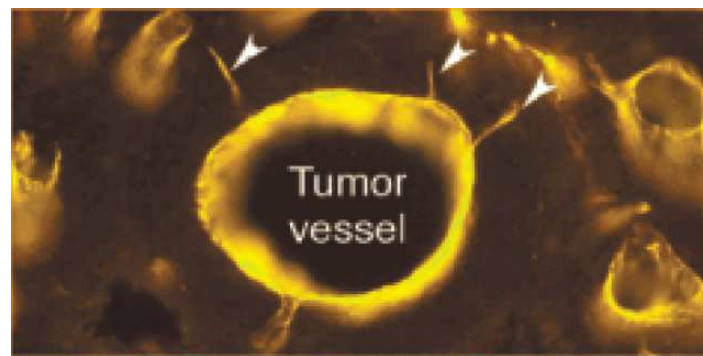


Tableau 1 Caractéristiques des vaisseaux normaux et des vaisseaux tumoraux (23)

Caractéristiques	Vaisseaux normaux	Vaisseaux tumoraux
Organisation	Normale	anormale
Couche péricytaire	Normale	Absente / détachée
Membrane basale	Normale	Absente / épaisse
Diamètre des vaisseaux	Normal	Dilaté
Densité vasculaire	Normale, distribution homogène	Anormale, distribution hétérogène
Perméabilité	Normale	Elevée
P° plasmatique/P° interstitielle (tumeur)	P>I	P~I
pO ₂	Normale	Hypoxie

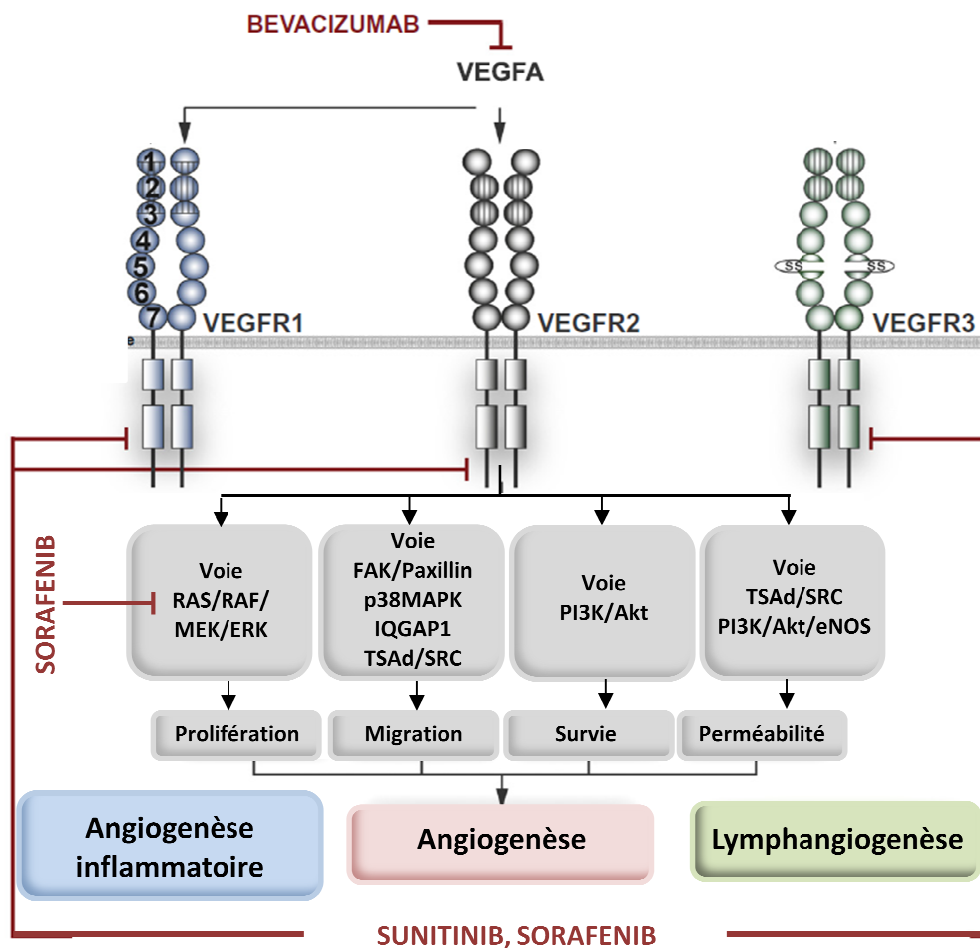
Du fait de cette dérégulation de l'expression du VEGF induisant une angiogénèse anormale responsable du développement des tumeurs solides et de la dissémination des métastases, l'industrie pharmaceutique s'est mise à développer dans les années 90 des molécules ciblant les principaux acteurs de l'angiogénèse tumorale. Ces molécules sont arrivées sur le marché dans les années 2000 et sont actuellement en plein essor puisque de nouvelles molécules continuent d'arriver sur le marché et de nouvelles indications sont attribuées aux molécules existantes. Les AAD constituent cette nouvelle classe d'anticancéreux et interagissent avec les voies d'activation de l'angiogénèse tumorale. Dans cette classe thérapeutique, on distingue les anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF avec comme chef de file le bevacizumab (Avastin, Roche), les inhibiteurs des tyrosines kinases des récepteurs au VEGF (ITK) avec principalement le sunitinib (Sutent, Pfizer) et le sorafenib (Nexavar, Bayer), et les inhibiteurs des effecteurs en aval de la signalisation comme les inhibiteurs de mTOR, avec comme chef de file le temsirolimus (Torisel, Pfizer).

2. Propriétés pharmacologiques et indications thérapeutiques des antiangiogéniques étudiés

Durant ce travail de recherche nous nous sommes intéressés à 3 molécules antiangiogéniques dont les propriétés pharmacologiques sont détaillées ci-dessous:

- Bevacizumab (AVASTIN) : un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF
- Sunitinib (SUTENT) : un inhibiteur de tyrosine kinases
- Sorafenib (NEXAVAR) : un autre inhibiteur de tyrosine kinases

Figure 6 Cibles du sorafenib, sunitinib et bevacizumab



2.1 Propriétés pharmacologiques du bevacizumab

Propriétés Pharmacodynamiques

Mécanisme d'action

Le bevacizumab (Avastin, Roche) est un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF qui se lie sélectivement au VEGF humain, facteur clé de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, et neutralise l'activité biologique **(24)** par inhibition de la liaison du VEGF à ses récepteurs (VEGFR-1 et -2) à la surface des cellules endothéliales **(25)**. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF fait régresser les vaisseaux tumoraux, normalise les vaisseaux tumoraux restants, et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, inhibant ainsi la croissance tumorale ayant ainsi comme effet pharmacodynamique d'inhiber la progression tumorale métastatique et de réduire la perméabilité micro-vasculaire.

Efficacité

L'efficacité et la tolérance du bevacizumab ont été démontrées dans des essais cliniques qui ont permis à cette molécule de recevoir l'AMM dans les indications suivantes :

- En association avec une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine chez les patients adultes atteints de cancer colorectal métastatique **(26)**
- En association avec le paclitaxel en première ligne du traitement du cancer du rein métastatique **(27)**
- En association avec la capecitabine en première ligne de traitement du cancer du rein métastatique **(28)**
- En association avec une chimiothérapie à base de sels de platine en première ligne de traitement du cancer bronchique non à petites cellules avancé et non opérable, métastatique ou en rechute **(29)**
- En association avec l'interféron alpha-2a en première ligne du cancer du rein avancé et/ou métastatique **(30)**
- En association avec du carboplatine + paclitaxel en première ligne des stades avancés du cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope, ou péritonéal primitif **(31)**
- En association avec du carboplatine + gemcitabine chez des patients adultes atteints de cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope, ou péritonéal primitif en première récurrence non préalablement traité par bevacizumab ou autre antiangiogénique. **(32)**

Propriétés pharmacocinétiques

Administration

Le bevacizumab se présente sous forme de solution à diluer pour perfusion intraveineuse. Il est administré aux doses de 5 ou 10mg/kg une fois toutes les 2 semaines ou 7.5 ou 15 mg/kg 1 fois toutes les 3 semaines en association avec une ou plusieurs chimiothérapies selon le type de cancer. La durée de la perfusion initiale est de 90 minutes et la vitesse de perfusion est ajustée en fonction de la tolérance. La pharmacocinétique du bevacizumab est linéaire aux doses allant de 1 à 10 mg/kg, avec une concentration plasmatique maximum (C_{max}) allant de 2.80 à 284 µg/ml pour des doses de 0,1mg/kg à 10mg/kg. L'état d'équilibre des concentrations plasmatiques est atteint à environ 100 jours.

Distribution

Le volume de distribution varie entre les hommes et les femmes, en moyenne, le volume de distribution (V_d) chez la femme est de 2.66l et chez l'homme 3.25l, ce qui représente une distribution tissulaire faible en raison du haut poids moléculaire. **(33)**

Métabolisme et Élimination

Le métabolisme du bevacizumab est similaire à celui de l'IgG endogène, principalement via un catabolisme protéolytique dans l'ensemble du corps, y compris les cellules endothéliales, il n'y a donc pas d'élimination rénale ou hépatique. La valeur de la clairance des patients est en moyenne égale à 0,207 L/jour chez la femme et à 0,262 L/jour chez l'homme. La demi-vie d'élimination est de 18 à 20 jours. La clairance du bevacizumab est accélérée d'environ 30 % chez les patients avec un taux bas d'albumine et de 7 % chez les patients avec charge tumorale élevée **(33)** Pas de modifications significatives des paramètres pharmacocinétiques du bevacizumab en fonction de l'âge, ni chez l'insuffisant rénal bien que très peu étudié, quelques case report montrent qu'il n'y a pas de modification chez les insuffisants rénaux hémodialysés **(34)** et il n'y a aucune données chez les insuffisants hépatiques.

2.2 Propriétés pharmacologiques du sunitinib

Propriétés pharmacodynamiques

Mécanisme d'action

Le sunitinib inhibe plusieurs récepteurs à tyrosine kinase impliqués dans la croissance tumorale, l'angiogénèse pathologique et la progression métastatique du cancer. Le sunitinib a

été identifié comme un inhibiteur des récepteurs du facteur de croissance plaquettaire (PDGFR α et PDGFR β), des récepteurs du VEGF (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3), du récepteur du facteur de croissance des cellules souches hématopoïétiques (cKIT), du récepteur Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3), du récepteur du facteur stimulant la formation de colonies (CSF-1R) et du récepteur du facteur neurotrophique de la lignée gliale (RET).

Le sunitinib a un métabolite principal, le SU012662 qui a le même pouvoir inhibiteur. **(35)**

Efficacité

L'efficacité et la tolérance du sunitinib ont été étudiées dans des essais cliniques permettant à cette molécule d'obtenir l'AMM en monothérapie pour les indications suivantes :

- Dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) malignes non résécables et/ou métastatiques chez l'adulte, après échec d'un traitement par imatinib dû à une résistance ou à une intolérance. **(36)**
- Dans le traitement des cancers du rein avancés ou métastatiques chez l'adulte. **(37)**
- Dans le traitement des tumeurs neuroendocrines du pancréas non résécables ou métastatiques, bien différenciées, avec progression de la maladie chez l'adulte. **(38)**

Propriétés pharmacocinétiques

Le schéma thérapeutique le plus répandu est un traitement journalier de 50mg de sunitinib par voie orale pendant 4 semaines suivi de 2 semaines d'arrêt de traitement : l'ensemble des 6 semaines constituant un cycle **(39)**. Ce schéma thérapeutique a été choisi à la demande des autorités de santé pour permettre aux patients de récupérer de l'éventuelle toxicité hématologique et surrénalienne **(35)**. Dans les tumeurs endocrines, la dose recommandée est de 37.5mg par voie orale, une fois par jour sans fenêtre thérapeutique. **(38)**

Absorption

La biodisponibilité relative du sunitinib est d'environ 70%. Les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) de sunitinib sont généralement atteintes entre 6 à 12 heures (T_{max}) après l'administration orale. L'absorption du sunitinib n'est pas modifiée par la prise d'aliment **(40)**. L'aire sous la courbe de concentration plasmatique en fonction du temps (AUC) et la C_{max} augmentent de façon proportionnelle en fonction de la dose. Sous l'effet répété des doses journalières, le sunitinib s'accumule et sa concentration est multipliée par 3 à 4, et celle de son principal métabolite actif par 7 à 10. Les concentrations à l'équilibre du sunitinib et de son principal métabolite actif sont atteintes en 10 à 14 jours. A l'état d'équilibre, les

concentrations plasmatiques cibles du sunitinib et de son métabolite actif sont comprises entre 62,9 et 101ng/ml. Le principal métabolite actif représente 23 à 37% de l'exposition au médicament.

Distribution

Le sunitinib et son principal métabolite actif se fixent aux protéines plasmatiques humaines à 95% et 90% respectivement indépendamment de la concentration. Le volume de distribution apparent du sunitinib (Vd) est important, 2230 litres, ce qui indique une distribution tissulaire majoritaire.

Biotransformation

Le sunitinib étant métabolisé par le CYP3A4, par conséquent, les puissants inhibiteurs de CYP3A4 tels que le kétoconazole, l'érythromycine ou le jus de pamplemousse peuvent provoquer une élévation de la Cmax et de la valeur de l'AUC0-∞. De même les puissants inducteurs de CYP3A4 tels que la rifampicine, dexaméthasone, le phénobarbital ou des préparations contenant du millepertuis peuvent provoquer une diminution de la valeur de la Cmax et de la valeur de l'AUC0-∞.

Elimination

L'excrétion se fait principalement par les selles (61%), seulement 16% de la dose de sunitinib administrée est éliminée par voie rénale. La demi-vie d'élimination du sunitinib est comprise entre 40 et 60 heures, celle de son principal métabolite actif entre 80 et 110 heures. (41)

Bien que métabolisé par le foie, il n'y a pas de modifications des concentrations plasmatiques en fonction de l'âge et chez les patients atteints d'une insuffisance hépatique légère ou modérée (classes A et B de Child-Pugh) (42), aucunes données ne sont disponibles chez les patients ayant une insuffisance hépatique sévère. Il en est de même chez les patients ayant une insuffisance rénale chronique. Cependant, bien que le sunitinib et son métabolite principal ne soient pas éliminés par hémodialyse chez les patients présentant une insuffisance rénale terminale, les concentrations plasmatiques totales sont inférieures par rapport aux patients ayant une fonction rénale normale, possiblement dû au phénomène d'absorption intestinale modifié chez ces patients et aux troubles de l'hydratation.

2.3 Propriétés pharmacologiques du sorafenib

Propriétés pharmacodynamiques

Mécanisme d'action

Le sorafenib diminue la prolifération des cellules tumorales. Il a une double action inhibitrice, premièrement au niveau des cellules tumorales en ciblant la voie de signalisation RAF/MEK/ERK et deuxièmement, au niveau de l'angiogénèse tumorale, en ciblant les récepteurs VEGFR et PDGFR.

Efficacité

L'efficacité et la tolérance du sorafenib ont été étudiées au cours d'essais cliniques permettant à cette molécule d'obtenir l'AMM en monothérapie pour les indications suivantes :

- Dans le traitement des cancers hépatocellulaires **(43)**
- Dans le traitement des cancers du rein avancé après échec d'un traitement préalable à base d'interféron alfa ou d'interleukine2 ou chez des patients pour lesquels ces traitements sont considérés comme inadaptés. **(44)**

Propriétés pharmacocinétiques

La dose de sorafenib recommandée chez l'adulte est de 400 mg deux fois par jour (soit une dose totale journalière de 800 mg) par voie orale. **(45)**

Absorption

La biodisponibilité relative du sorafenib est de 38 - 49 %. La biodisponibilité absolue n'est pas connue. Après administration orale, la concentration plasmatique maximale du sorafenib (C_{max}) est atteinte en environ 3 heures (T_{max}). Après un repas riche en graisses, l'absorption du sorafenib est réduite de 29 %, il est recommandé de le prendre en dehors des repas. Deux prises de 400mg chacune entraînent une meilleure exposition qu'une seule prise par jour car le sorafenib est peu soluble et ne se dissout pas totalement dans le tractus digestif à forte dose en prise unique. **(46)** Les concentrations plasmatiques du sorafenib à l'équilibre sont atteintes en 7 jours, avec un rapport des concentrations moyennes maximales et minimales inférieur à 2.

Distribution

La liaison aux protéines plasmatiques du sorafenib est de 99,5 %, principalement liée à l'albumine. Le sorafenib est largement distribué dans les tissus et se retrouve dans le lait maternel.

Biotransformation

Le sorafenib est principalement métabolisé dans le foie par le CYP3A4, et subit une glucuroconjugaison assurée par l'UGT1A9 dans les reins. Le principal métabolite du sorafenib circulant dans le plasma, le pyridine N-oxyde, a une activité in vitro comparable à celle du sorafenib.

Elimination

La demi-vie d'élimination du sorafenib est d'environ 25 à 48 heures. Le sorafenib est principalement excrété dans les fèces (77%) et dans les urines (19 %). Pas de modifications de propriétés pharmacocinétiques chez les patients âgés, les insuffisants rénaux (IRC légère à sévère). Très peu de données sont disponibles concernant les IRT, quelques cas suggèrent qu'il n'y a pas de modifications des propriétés pharmacocinétiques bien que les concentrations plasmatiques soient inférieures à celles des patients avec une fonction rénale normale. (47). L'exposition est comparable chez les insuffisants hépatiques (légère à modérée). Aucune données ne sont disponibles chez les patients atteints d'insuffisance hépatique sévère (Child Pugh C). Le sorafenib étant principalement éliminé par le foie, l'exposition pourrait augmenter dans cette population de patients, mais aucune données ne sont disponibles. (46,48)

1.4.Suivi thérapeutique pharmacologique des antiangiogéniques

Le suivi thérapeutique pharmacologique permet de surveiller l'exposition aux AAD à partir des dosages des concentrations plasmatiques de ces médicaments. Ce suivi nécessite des techniques de dosage fiables et précises. A partir des données de concentration plasmatique, les pharmacologues et cliniciens déterminent si le patient est correctement exposé au traitement en se basant sur les relations concentrations/effets de ces molécules (35,49), mais également en se basant sur les relations entre les concentrations et les toxicités (50,51). Enfin à partir des données cliniques et pharmacologiques, le but est d'exposer au mieux les patients en ajustant la posologie tout en évitant les toxicités liées à la prise de ces traitements. Le STP des antiangiogéniques est en pleine recherche, en effet, il existe une variabilité

interindividuelle très importante des concentrations plasmatiques de ces molécules dont les causes ne sont pas encore tout à fait connues (52). Il en est de même pour la réponse interindividuelle au traitement, également très variable.

3. Atteintes cardiovasculaires et rénales des antiangiogéniques

En inhibant la signalisation du VEGF mais également du PDGF, le bevacizumab, le sorafenib et le sunitinib s'accompagnent d'effets indésirables cardiovasculaires et rénaux. Les effets indésirables les plus fréquents sont décrits ci-dessous :

3.1 L'hypertension artérielle

Présente chez 20-40% des patients selon les études. Cette hypertension artérielle est très probablement sous-estimée du fait de l'utilisation de la définition de l'hypertension de la NCI-CTCAE (53) par les oncologues qui est moins rigoureuse que celle utilisée par les cardiologues provenant des sociétés savantes de cardiologie (ESH/ESC) (54) (Tableau 2). Cette discordance rend ainsi plus difficile l'interprétation des données de la littérature (55)

Tableau 2. Critères définissant les grades de l'hypertension artérielle selon la CTCAE et l'ESH/ESC

	CTCAE	ESH/ESC 2013
Grade I	<ul style="list-style-type: none"> Asymptomatique, transitoire (<24h) Augmentation PAD>20mmHg ou PA>150/100mmHg Chez hypertendu antérieur, sans intervention thérapeutique 	<p>PAS<>140-159 et/ou PAD<>90-99</p> <ul style="list-style-type: none"> Si pas d'autres FDR, changement de mode de vie, puis introduction d'un traitement antihypertenseur si pression toujours non contrôlée. Si autres FDR, modification du mode de vie plus introduction d'un traitement antihypertenseur
Grade II	<ul style="list-style-type: none"> Récidivante, persistante (>24h) ou symptomatique Augmentation PAD>20mmHg ou PA>150/100mmHg Chez hypertendu antérieur avec nécessité d'introduire 1 monothérapie 	<p>PAS<>160-179 et/ou PAD<>100-109</p> <ul style="list-style-type: none"> <u>Si pas d'autres FDR</u> : changement de mode de vie pendant quelques semaines puis introduction d'un traitement si PA non contrôlée. <u>Si autres FDR</u> : modification du mode de vie plus introduction d'un traitement
Grade III	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité d'introduire un traitement médicamenteux supplémentaire 	<p>PAS≥180 et/ou PAS≥110</p> <ul style="list-style-type: none"> Introduction d'un traitement antihypertenseur immédiatement.
Grade IV	Mise en jeu du pronostic vital	

3.2 Les atteintes cardiovasculaires

Dans la littérature il est rapporté des cas d'allongement de l'espace QT, d'insuffisance cardiaque avec diminution de la FEVG dans 10% des cas sous sunitinib (56). Des cas de leuco-encéphalopathie postérieure réversible ont également été rapportés sous sunitinib (57). Sous sorafenib ont été reporté des évènements thromboemboliques artériels avec une incidence de 1.4% (95% CI, 1.2% to 1.6%) (58), d'infarctus ou ischémie cardiaque avec une incidence de 4.9% (59,60).

3.3 Les atteintes rénales

La plus fréquente étant la protéinurie, très souvent associée à l'HTA, l'incidence varie entre 21 et 64% des cas selon les études. D'autres atteintes rénales ont été observées : syndrome néphrotique, insuffisance rénale aiguë, glomérulopathies prolifératives, et néphrites interstitielles, mais également des microangiopathies thrombotiques. (55) Une augmentation de la créatinine apparaît chez près de 66% des patients ayant un cancer du rein et 12.4% chez des patients ayant un cancer GIST. (36,37)

Dans le cancer du rein métastatique, la première intervention avant l'introduction d'un traitement antiangiogénique est la néphrectomie partielle ou élargie du rein abritant la tumeur. Les conséquences sur la fonction rénale après néphrectomie élargie ont été étudiées et il a été montré que les facteurs de risque de dégradation de la fonction rénale après néphrectomie étaient le sexe masculin et les FDR cardiovasculaires tels que l'âge avancé, l'hypertension artérielle et le diabète non-insulinodépendant. (61) Dans un modèle murin Machado et al ont étudié l'effet de la néphrectomie et celui de l'introduction du sunitinib, il a été montré que la néphrectomie induisait une glomérulosclérose qui était aggravée par l'introduction du sunitinib. Mais le sunitinib n'avait pas d'effet sur la fonction rénale chez les rats n'ayant pas d'atteinte rénale préexistante, confirmant ainsi les résultats de l'étude clinique. (62)

4. Physiopathologie et prise en charge de l'hypertension induite par les AAD

4.1 Caractéristiques de l'hypertension induite par les AAD

L'HTA induite par les AAD est fréquente et (63) dose-dépendante. (55) L'élévation de la PA survient généralement dès les premiers jours de traitement, (64) les patients soient initialement normotendus ou hypertendus, et est réversible à l'arrêt du traitement (65). Elle est généralement contrôlable par les traitements antihypertenseurs. (63,66) L'HTA sous AAD

partage plusieurs aspects de l'HTA essentielle, elle peut participer à la survenue d'accidents graves à court terme (67): ischémie myocardique sous Sorafenib (68), insuffisance cardiaque avec diminution de la FEVG dans 10% des cas sous Sunitinib (56), leuco-encéphalopathie postérieure réversible. (57) Ces différentes pathologies sont généralement associées à l'hypertension induite par les AAD, cependant, il est possible qu'elles procèdent d'une physiopathologie différente, au travers de l'atteinte des petits vaisseaux des organes concernés. Les conséquences des traitements AAD à long terme ne sont pas encore connues mais elles rejoignent très probablement celles de l'HTA essentielle reconnue comme facteur de risque d'évènement coronaire, cérébral et rénal (69). Ces complications sont d'autant plus préoccupantes que l'espérance de vie des patients traités pour un cancer s'améliore, et que la proportion de patients âgés parmi les patients suivis pour un cancer est en augmentation. (70)

4.2 Mécanismes physiopathologiques de l'hypertension induite par les AAD

La physiopathologie de cette hypertension artérielle iatrogène reste méconnue. L'HTA induite par les AAD serait la conséquence de l'inhibition des effets physiologiques du VEGF au niveau de la cellule endothéliale et donc de la paroi vasculaire. (71) Les AAD induiraient une inhibition de la NO synthase avec pour effet une réduction de la libération de NO par les cellules endothéliales en réponse aux stimuli. (55, 72) Une atteinte des petites artères est également très probable avec une raréfaction artériolaire et capillaire, un remodelage des micro-vaisseaux par effet des AAD, et une atteinte fonctionnelle par réduction de la vasodilatation endothélium-dépendante traduisant une dysfonction endothéliale. (73,74) Cette dysfonction endothéliale ciblée sur la NO synthase conduirait à un déséquilibre en faveur de l'endothéline-1 qui a principalement un effet vasoconstricteur. Cette vasoconstriction serait partiellement indépendante de la diminution de la biodisponibilité du NO et de l'augmentation du stress oxydatif. (75,76) L'atteinte de la microcirculation serait donc en partie responsable de l'augmentation de la pression artérielle observée chez les patients traités par AAD.

4.3 Prise en charge de l'hypertension induite par les AAD

Bien que l'espérance de vie des patients atteints de cancer métastatique avec ou sans facteurs de risque cardiovasculaires soit en moyenne plus courte que celles de patients hypertendus essentiels, l'augmentation de pression induite par les AAD doit impérativement être prise en charge. En effet, il a été montré que les effets indésirables sévères liés à la prise d'AAD étaient associés à cette augmentation de pression empêchant parfois l'administration de la dose efficace d'AAD. L'élévation de la pression artérielle peut être importante et ce, après

seulement quelques jours de traitements et il n'existe aucun facteur prédictif d'une telle augmentation. De plus, certaines études montrent que l'absence de prise en charge des facteurs de risque diminuerait la survie des patients tout autant que le stade de la maladie carcinologique. Enfin, certains patients peuvent être traité sur du long terme par AAD d'où le caractère impératif de la prise en charge de l'HTA pour éviter les événements cardiovasculaire liés à l'HTA tels que l'AVC, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque ou rénale. (77)

De ce fait, la pression artérielle des patients est suivie de près, en auto-mesure principalement, essentiellement lors des premiers cycles d'antiangiogénique où l'incidence et la sévérité de l'hypertension sont plus fréquentes, selon les recommandations. (77) En cas de pression artérielle élevée, un traitement antihypertenseur peut être initié. Aucune étude n'a permis pour le moment d'établir quelle classe d'antihypertenseur était la plus adaptée à cette population. Nous disposons cependant de quelques éléments de réponses mais en absence d'étude comparative, le choix de l'hypertenseur se fait selon les pratiques internes des services d'oncologie et selon les facteurs de risques des patients.

De manière générale dans les études, les classes les plus souvent utilisées sont les bloqueurs du système rénine-angiotensine (SRA) et les inhibiteurs calciques (IC). Les bloqueurs du SRA permettent un contrôle rapide de la pression artérielle, alors que les IC ne sont efficaces qu'au bout de quelques jours. L'amlodipine, IC de la classe des dihydropyridines diminue la pression artérielle en diminuant la contractilité des cellules musculaires lisses ; certaines études montrent son efficacité dans cette population. (78) Par contre les molécules non-dihydropyridines sont déconseillées du fait de leur action inhibitrice du CYP3A4 et du risque d'interaction avec le métabolisme du sorafenib et du sunitinib. Les bloqueurs du SRA sont fréquemment utilisés dans la prise en charge de l'hypertension artérielle essentielle et sont également un bon choix dans cette population, essentiellement chez les patients développant une protéinurie, ou en cas d'association de traitements antihypertenseurs. Ces traitements ont un effet néphroprotecteur cependant sont contre-indiqués chez les patients avec une sténose bilatérale des artères rénales ou unilatérale sur rein unique, et chez les patients avec une hyperkaliémie. Une étude préclinique à comparé un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC), le captopril à un IC dihydropyridine, la nifedipine et ont montré que les rats chez qui l'augmentation de pression était supérieure à 35mmHg, la nifedipine était plus efficace que le captopril, probablement du fait d'un rétrocontrôle négatif du SRA face à cette poussée tensionnelle. (79) Cependant la nifedipine a été montrée comme induisant la sécrétion de

VEGF et donc dans le cadre d'une thérapie antiangiogénique, son utilisation serait donc à éviter. **(80)** Concernant l'utilisation des diurétiques thiazidiques il existe une controverse concernant leur efficacité dans cette population, bien que très efficaces dans la prise en charge de l'hypertension artérielle essentielle. Pour finir, partant du principe que l'hypertension artérielle induite par les AAD est en partie due à la diminution de la biodisponibilité de NO, des équipes commencent à s'intéresser à l'efficacité de médicaments augmentant la libération de NO, tels que les nitrates, les inhibiteurs de phosphodiesterase, ou le nébivolol qui est un β -bloquant vasodilatateur, mais peu de données sont disponibles pour juger de l'efficacité de ces traitements dans cette population.**(81)**

5. Marqueurs précoces d'efficacité des AAD

Il y a eu de nombreuses tentatives de découverte d'un biomarqueur précoce d'efficacité des traitements antiangiogéniques dans le but de détecter au plus tôt les patients répondeurs ou non répondeurs et ainsi de décider de l'utilité d'un ajustement des AAD afin d'optimiser l'efficacité et la tolérance de ces traitements, mais cela reste un défi. L'hypertension induite par les antiangiogéniques et certains polymorphismes de gènes impliqués dans l'angiogénèse semblent à ce jour être les marqueurs précoces d'efficacité les plus probables. Plusieurs études ont montré que les polymorphismes VEGF-2578AA et VEGF-1154AA seraient associés à une meilleure survie chez les patients traités par bevacizumab. Cependant ces paramètres ne peuvent à ce jour être considérés comme biomarqueurs d'efficacité tels quels car de nombreuses questions demeurent non résolues.

L'effet bénéfique de l'HTA induite par les AAD sur la survie des patients a été très étudié dans la mesure où celle-ci pourrait constituer un marqueur tissulaire de l'efficacité de ces traitements. La majorité des études montrent un bénéfice significatif et d'autres pas, cependant la surreprésentation des études positives pourrait aussi constituer un biais de publication. **(82,83)** Tout d'abord, il faudrait se mettre d'accord sur la définition de l'hypertension artérielle (PA>150/100mmHg ou 140/90mmHg ou augmentation de la PA supérieure à 20mmHg) ; elle n'est pas la même dans toutes les études et pourrait expliquer le fait que des études ne retrouvent pas les bénéfices attendus de l'hypertension sur la survie. Ensuite, ces bénéfices sont-ils retrouvés chez des patients initialement hypertendus ou chez les patients développant de l'hypertension suite à la prise d'AAD uniquement ? La durée de l'hypertension joue-t-elle un rôle dans la valeur prédictive de l'hypertension ? Les patients développant l'HTA en quelques jours et ceux qui développent une HTA progressive sont-ils

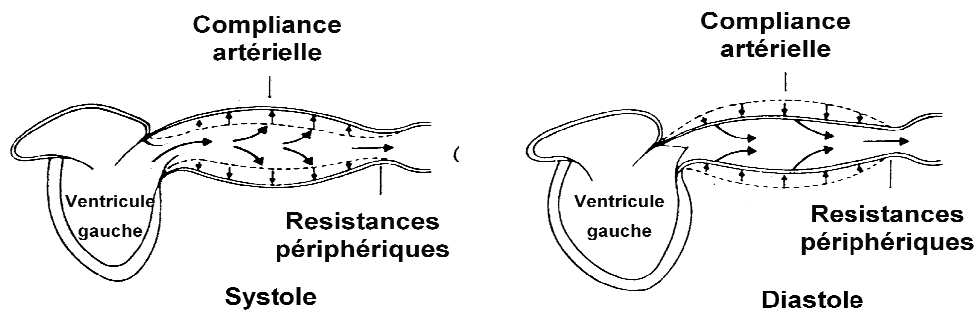
tous concernés par ces bénéfices sur la survie? La prise en charge de l'hypertension influence-t-elle le bénéfice de ces traitements ? (84)

D'autres recherches sur des protéines circulantes de l'angiogénèse, des cellules endothéliales circulantes et ou leurs progéniteurs de cellules souches, et l'imagerie vasculaire semblaient prometteuses mais à ce jour les résultats initiaux n'ont pas été retrouvés dans la majorité des études. (85,86)

6. La rigidité artérielle

La rigidité artérielle des grosses artères élastiques est définie comme la perte de la fonction de compliance qui est la capacité de se déformer et d'emmagasiner le débit sanguin provenant du ventricule gauche lors de la systole et de le restituer lors de la diastole, permettant ainsi de perfuser par un débit constant l'ensemble des organes et tissus de l'organisme. La deuxième principale fonction de la compliance des artères élastiques est d'amortir la pression artérielle le long de l'arbre artériel afin de protéger les principaux organes tels que le cerveau et les reins.

Figure 7 Compliance de l'aorte au cours du cycle cardiaque



6.1 Structure et composition des grosses artères

La paroi artérielle est constituée de trois feuillets : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 8**). La média est le siège de la majorité des propriétés élastiques des grosses artères, elle est constituée d'un seul type cellulaire, les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires s'appuyant sur une matrice extracellulaire (MEC) constituée d'élastine, de collagène, et de protéoglycanes. Ces éléments de même que leurs arrangements géométriques et leurs interactions confèrent à la paroi ses propriétés mécaniques. **(87)**

L'élastine représente 25% du volume de l'aorte thoracique et confère une grande élasticité aux grosses artères. Le collagène représente 35% du volume de la média des grosses artères, les fibres de collagène sont assemblées en réseau ce qui confère aux grosses artères une certaine flexibilité et est responsable de la cohésion du tissu. Les grosses artères élastiques, type aorte, carotides, sont riches en élastine et pauvres en collagène et CML. Les CML représentent 30 à 50% du volume de la média. La média aortique est composée par l'empilement de « feuillets musculo-élastiques constitués de CML enveloppées par des fibres élastiques organisées en lames concentriques fenestrées orientées suivant le grand axe des cellules. **(88-90)**. Les liaisons entre les CML et la MEC impliquent des protéines d'adhésion type fibronectine, laminines ainsi que leurs récepteurs, les intégrines. Cette structure est dynamique, conduisant à des réorganisations.

Figure 8. Structure en trois feuillets de la paroi des artères (Schéma d'Alain Gallien)

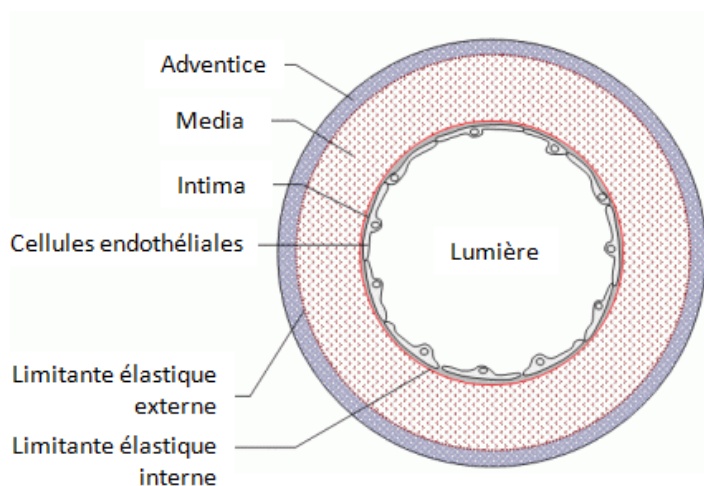
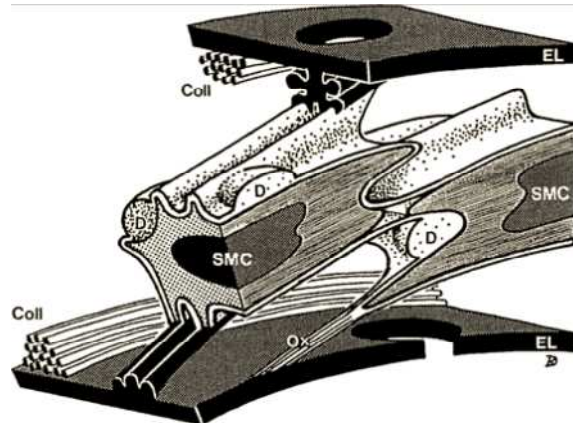


Figure 9 Représentation schématique de la structure pariétale de la média entre deux lames élastiques (90)



EL : lame élastique ; SMC : cellules musculaires lisses ; Coll : fibres de collagène épaisses (types I, III, V) ; Ox : microfibrilles contenant de la fibrilline et du collagène VI ; D : dépôts contenant du collagène IV et des protéoglycanes

Figure 10 Structure organisée de la media d'une artère élastique. Connections entre les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire. (91)

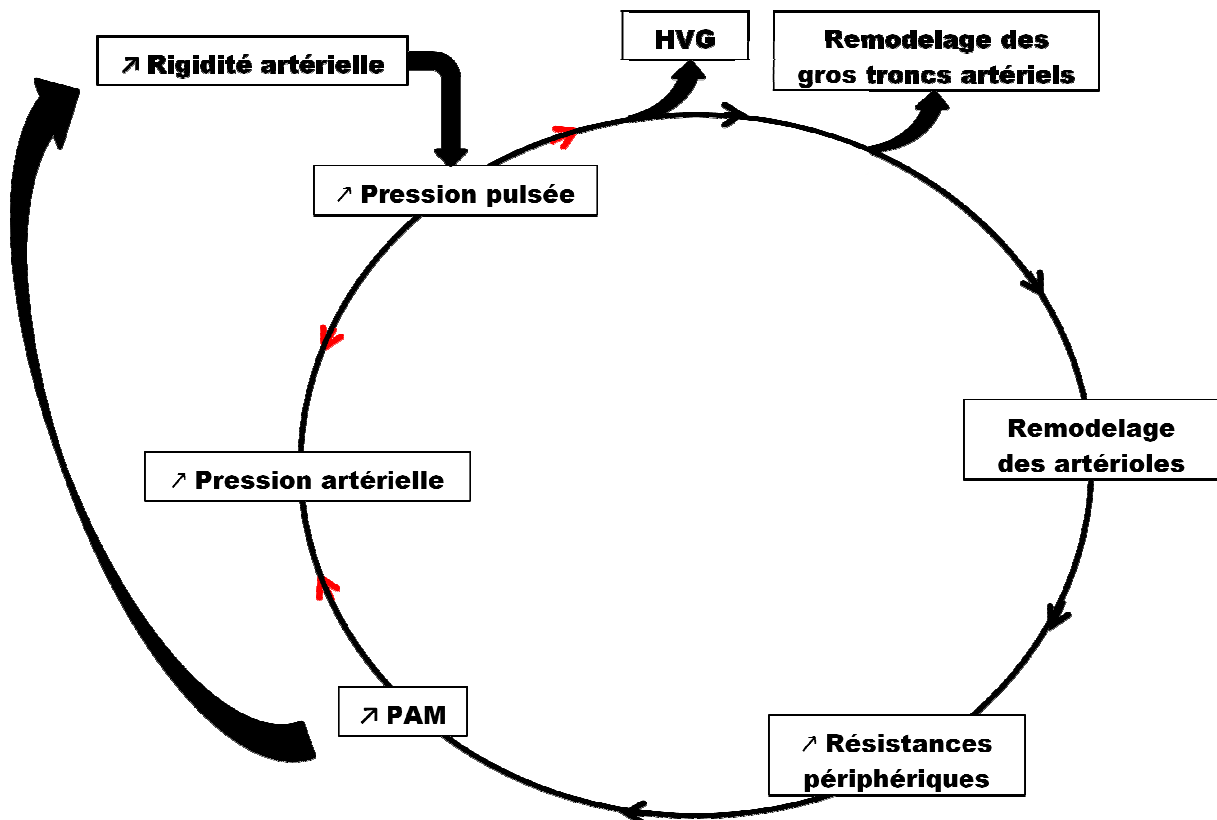


Microscopie électronique à transmission. Reconstitution à partir d'une dizaine d'images

6.2 Déterminants de la rigidité artérielle des grosses artères

Les propriétés élastiques des grosses artères conditionnent l'atteinte des organes cibles tels que le cœur, le cerveau et le rein. Une augmentation de la rigidité artérielle entraîne une augmentation de la pression pulsée centrale (PPc). Cette hyperpulsatilité est responsable de l'hypertrophie ventriculaire gauche, du remodelage des gros troncs artériels et des artéioles. S'en suit un cercle vicieux car l'atteinte des petites artères, induit une augmentation de la pression artérielle moyenne (PAM) responsable de l'augmentation de rigidité artérielle. (Figure 11)

Figure 11. Physiopathologie de l'augmentation de pression et de la rigidité artérielle



Les deux principaux déterminants de la rigidité artérielle sont le niveau moyen de pression artérielle et le vieillissement.

Toute augmentation de pression induit des modifications des propriétés élastiques et donc une augmentation de rigidité artérielle. (92) Le collagène et l'élastine possèdent des constantes

d'élasticité différentes, en effet le collagène est 1000 fois plus rigide que l'élastine. La paroi d'une grosse artère souple est composée essentiellement d'élastine car il y a de relativement faibles taux d'étirements, en revanche plus la pression artérielle augmente, plus l'étirement est important ce qui active le recrutement de collagène rendant l'artère plus rigide. Ceci explique l'augmentation de la rigidité avec la pression. Parallèlement, l'aorte est l'artère la plus élastique, et plus on s'éloigne du cœur moins il y a de fibres élastiques, plus les artères sont rigides.

L'augmentation de rigidité induite par une augmentation de pression est causée par un recrutement du collagène mais également par la réorganisation et les attaches des constituants de la paroi. **(87)** En effet, les quantités d'élastine et de collagènes ne peuvent expliquer à elles seules, les différences de rigidité. Dans le cas de l'hypertension artérielle, l'augmentation de rigidité est la conséquence d'un remodelage chronique de la paroi qui s'épaissit (hypertrophie de la média) **(93)** et se densifie en fibre, et modifie son organisation 3D, persistant malgré le contrôle de la pression artérielle. **(94,95)** Mais il n'y a pas d'augmentation de la rigidité du matériau constituant la paroi.

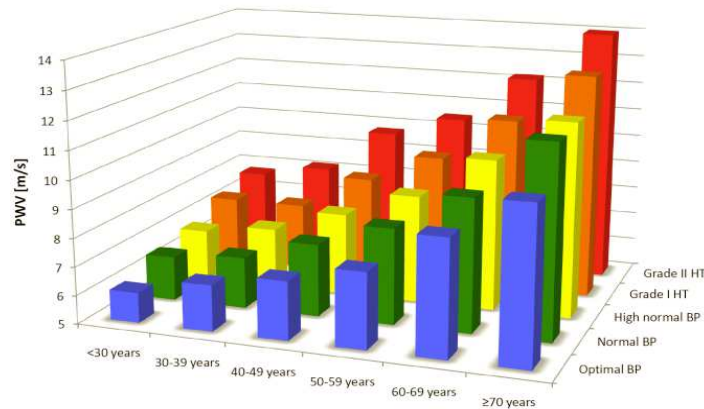
Le vieillissement est le déterminant le plus important de la rigidité artérielle, au fil des années, la rigidité peut aller jusqu'à tripler. **(96,97)** Il ne touche que les grosses artères élastiques comme l'aorte et les carotides, **(98)** éventuellement les fémorales. L'augmentation de rigidité liée au vieillissement est due à une dégradation de la MEC, une altération des fibres d'élastine qui conduit à une dilatation de la paroi et un recrutement précoce de collagène rendant les artères plus rigides. On note également une hypertrophie des artères avec le vieillissement, essentiellement au niveau de l'intima induisant une augmentation de l'épaisseur intima-média (IMT). L'augmentation de rigidité liée au vieillissement contrairement au cas de l'hypertension est liée à une augmentation de rigidité du matériau par augmentation de la rigidité des fibres de collagène et une diminution du rapport élastine/collagène. **(99,100)**

6.3 Vitesse de propagation de l'onde pouls

La vitesse de propagation de l'onde de pouls (VOP) le long de l'aorte thoraco-abdominale est un indice de rigidité globale parfaitement validé. Ce paramètre est accepté comme marqueur de risque cardiovasculaire remplissant à l'heure actuelle 4/6 des étapes pour être validé comme biomarqueur cardiovasculaire. **(101)** La preuve de concept a été faite car la valeur de la VOP se trouvait plus élevée chez les patients avec une maladie cardiovasculaire, chez les patients insuffisants rénaux et dans d'autres maladies non-cardiovasculaires. Les valeurs de

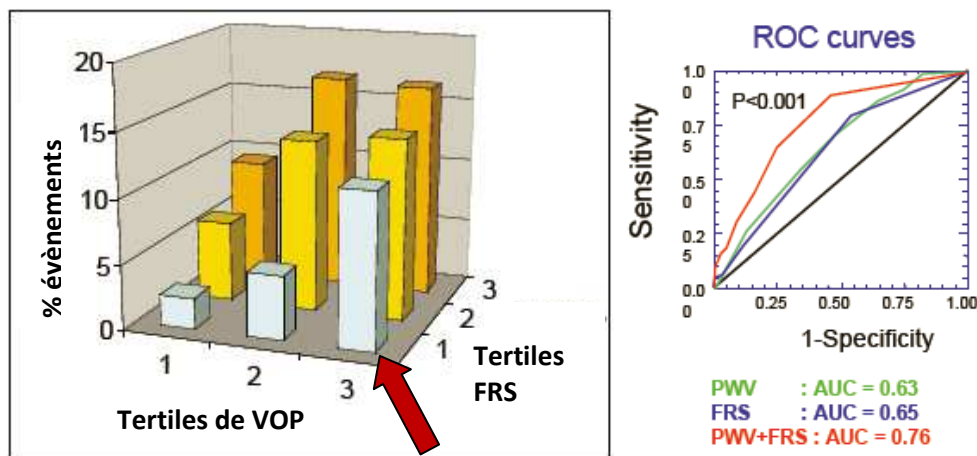
référence de la VOP en fonction de l'âge et de la pression ont été publiées en 2010 sur une population de plus de 11 000 sujets. (figure 12) (96)

Figure 12 Valeurs de référence de la VOP en fonction de l'âge et de la pression artérielle



La VOP est un facteur prédictif de la morbi-mortalité cardiovasculaire et de la mortalité toutes causes confondues, indépendamment des autres facteurs de risque chez l'hypertendu (102-104), chez l'insuffisant rénale (105), chez le sujet âgé (106,107), chez le sujet diabétique (108) et dans la population générale (109). Une rigidité artérielle élevée de l'aorte est associée à un risque augmenté par rapport à des patients ayant une aorte souple. (104) Une méta-analyse réunissant 17 études longitudinales avec plus de 15 000 sujets confirme qu'une VOP élevée est associée à un risque plus élevé de faire un évènement cardiovasculaire ou de décéder de cause cardiovasculaire ou non-cardiovasculaire (110,111). La VOP apporte une valeur ajoutée au score de Framingham dans l'évaluation du risque cardiovasculaire. Pour un score de Framingham bas, le fait d'avoir une VOP élevée est associée à un plus grand nombre d'évènements CV (figure 13). (104)

Figure 13 Risque d'évènement coronarien en fonction de la VOP et du score de Framingham



La mesure de la VOP est maintenant intégrée dans les recommandations européennes pour l'évaluation de l'atteinte des organes cibles, que sont le cœur, le cerveau et les reins, et pour la prise en charge de l'hypertension artérielle, (54) avec une valeur seuil à 10m/s après ajustement d'un facteur 0.8. La prise en compte de l'atteinte des organes cibles, comme une rigidité aortique élevée, améliore la prédiction du risque cardiovasculaire, entraînant une reclassification des patients dans la prise en charge thérapeutique (112). A l'heure actuelle il reste à élucider la question suivante : la diminution de la rigidité artérielle entraîne-t elle une moindre incidence des évènements cardiovasculaires ? Une première étude a apporté le premier élément de réponse en montrant qu'une diminution de la VOP était associée à une meilleure survie dans l'insuffisance rénale terminale (113) mais c'est l'étude SPARTE menée par le Pr Laurent, qui a pour objectif de répondre à la question grâce à une étude multicentrique française, randomisée, comparant selon un schéma PROBE un bras dont la prise en charge thérapeutique est fonction des recommandations actuelles et un bras dont la prise en charge thérapeutique est fonction des valeurs de VOP.

6.4 Les ondes de réflexion

Le phénomène de réflexion peut être mesuré grâce à l'analyse morphologique de l'onde de pression. A chaque systole, une onde de pression se propage du cœur vers la périphérie à une vitesse correspondant à la VOP. Cette onde de pression est réfléchi au niveau des sites de réflexion et retournent vers le cœur créant une onde de réflexion qui va pouvoir se rajouter à l'onde incidente plus ou moins tôt au cours de la systole en fonction de la rigidité artérielle, de l'anatomie du tronc artériel, du débit cardiaque et d'autres paramètres (figure 14). L'index

d'augmentation (AIx) qui est le rapport entre la pression pulsée et l'amplitude de l'onde incidente est une estimation directe de l'intensité de l'onde de réflexion. L'AIx est utilisé pour mesurer la charge supplémentaire imposée au ventricule gauche et dépend au moins en partie de la rigidité aortique et de manière générale de la rigidité des grosses artères. En effet, plus les artères sont rigides, plus la vitesse de propagation de l'onde de pouls est élevée et plus les ondes seront réfléchies au niveau des bifurcations principales et reviendront plus rapidement, entraînant une augmentation de pression en systole (**figure 15**). L'AIx dépend également des modifications du tonus vasculaire des petites artères (**114,115**), de la fréquence cardiaque, de l'âge, de la pression artérielle et de la taille du patient (**116,117**). De manière simplifiée l'AIx reflète, en un seul paramètre, les propriétés mécaniques des grosses et petites artères et le débit cardiaque.

Tout comme la VOP, l'AIx est un marqueur prédictif de mortalité cardiovasculaire et de toutes causes confondues indépendamment des autres facteurs de risques chez les insuffisants rénaux en phase terminale (**118**), chez les hypertendus (**119**), chez les patients avec une maladie coronarienne. (**120**)

Des valeurs de références de l'AIx, en fonction de l'âge et du sexe ont été publiées en 2010 sur une population de 3000 patients, d'autres études de ce type devront donc valider ces résultats sur un plus grand nombre de sujets. (**117**)

Notons bien que l'index d'augmentation dépend de la rigidité artérielle mais n'est qu'une mesure indirecte, un marqueur de substitution de la rigidité artérielle, alors que la VOP est une mesure directe de la rigidité artérielle. Ces deux paramètres ne sont pas interchangeables et apportent chacun des informations complémentaires.

Figure 14. Représentation graphique de l'effet des ondes de réflexion sur la pression centrale.

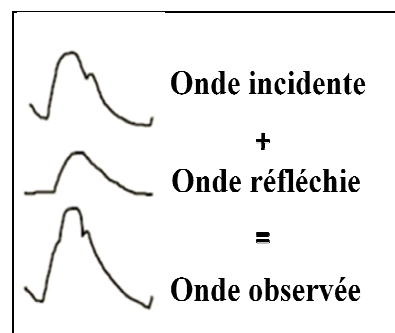
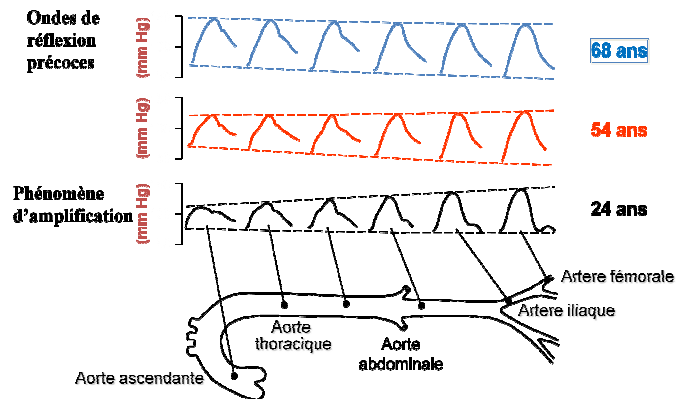


Figure 15. Représentation du phénomène d'amplification chez le sujet jeune avec des artères distensibles qui s'estompe avec l'âge et la rigidité des artères.



PROBLEMATIQUE

En inhibant la voie du VEGF, les AAD induisent une augmentation de la pression artérielle chez plus de 30% des patients. Cette hypertension apparaît dès les premiers jours de traitement. Il a été montré qu'il y avait une atteinte de la microcirculation traduite par une diminution de la biodisponibilité d'oxide nitrique, une raréfaction capillaire et une dysfonction endothéliale chez les patients traités par AAD. Cependant ces mécanismes ne semblent ne pas pouvoir à eux seuls expliquer l'augmentation de pression artérielle en si peu de temps d'exposition à ces traitements. Dans l'hypertension essentielle, un des mécanismes de l'augmentation de pression artérielle est l'augmentation de la pulsatilité induite par la perte de compliance des grosses artères. Une atteinte des gros vaisseaux pourraient donc jouer un rôle dans la physiopathologie de l'hypertension induite par les AAD, au travers de plusieurs mécanismes: (1) une ischémie médiale accompagnée d'une inflammation par destruction des vasa-vasorum avec fibrose secondaire (121) et (2) une atteinte endothéliale. L'étude de l'atteinte des grosses artères au cours du traitement antiangiogénique n'est que peu investiguée ; dans la littérature, deux études sur un petit nombre de patients (65,122) et un cas clinique rapportent une augmentation de la rigidité artérielle sous AAD (123) et ne permettent pas de déterminer précisément le rôle des grosses artères dans l'augmentation de pression.

L'hypertension induite par les AAD du fait de son apparition précoce chez un grand nombre de sujet a été proposée comme marqueur d'efficacité de ces traitements. Cependant, il existe une controverse dans la littérature concernant l'association entre l'hypertension induite par ces traitements et la réponse carcinologique, laissant de la place à la recherche d'autres marqueurs potentiels d'efficacité. Les modifications des propriétés mécaniques des grosses artères sous AAD pourraient traduire une réponse carcinologique précoce et ayant pour avantage d'être moins labile que l'hypertension artérielle.

La mesure de paramètres artériels au moyen de techniques non invasives permet d'avoir un aperçu de l'état des artères avant le traitement AAD et de suivre l'évolution de ces paramètres au décours du traitement. De même la mesure sérique des concentrations d'AAD permet d'établir un suivi thérapeutique pharmacologique. Ces techniques sont utilisables en routine et permettent la mise en place d'une étude clinique prospective.

Hypothèses de travail

Notre première hypothèse de travail est qu'il existe une atteinte des grosses artères spécifique des antiangiogéniques, en partie responsable de l'augmentation de pression observée sous antiangiogénique, et que cette atteinte artérielle est associée à l'efficacité carcinologique des AAD. Notre deuxième hypothèse est que l'exposition aux AAD, estimée par le dosage des concentrations plasmatiques, est responsable de l'atteinte artérielle par un effet pharmacologique de ces traitements sur la paroi artérielle.

Objectifs

- Etudier les variations de pression, de rigidité et de remodelage artériel au décours de la prise d'AAD
- Etablir les déterminants de l'augmentation de pression sous AAD
- Démontrer la valeur prédictive des paramètres de rigidité sur la progression tumorale et la mortalité
- Démontrer que l'exposition aux AAD déterminée par les concentrations plasmatiques induit une augmentation de la VOP indépendante de l'augmentation de la pression artérielle.
- Quantifier l'influence des concentrations plasmatiques d'AAD et de l'augmentation de pression artérielle moyenne sur l'augmentation de rigidité artérielle.
- Démontrer la valeur prédictive de l'exposition aux AAD sur la réponse carcinologique.
- Etablir un seuil de concentration plasmatique du sorafenib et du sunitinib permettant de discriminer les patients sous-exposés des autres.

Présentation des articles

Article 1: Single point measurement of PWV with Arteriograph®: which arterial pathway?

Article 2: Hypertension after antiangiogenic drugs: changes in arterial mechanical properties and association with cancer progression and mortality

Article 3: Relationship between large arteries properties changes, antiangiogenic drugs exposure and efficacy.

MATERIEL ET METHODES

Cette thèse est centrée sur l'étude des modifications des paramètres de rigidité et de remodelage des grosses artères sous traitement antiangiogéniques. A cette fin, dans ce chapitre nous détaillerons le schéma de l'étude clinique longitudinale qui a été mise en place dans le service d'oncologie de l'hôpital Cochin à Paris puis nous détaillerons les techniques utilisées pour mesurer les différents paramètres artériels ainsi que pour les dosages dans antiangiogéniques.

La rigidité artérielle peut être mesurée de manière non-invasive au moyen de la tonométrie d'aplanation par le calcul de la VOP-CF. Les ondes de réflexions sont un marqueur indirect de la rigidité artérielle et de l'état de la microcirculation. Elles peuvent être quantifiées par l'index d'augmentation qui est mesuré par tonométrie d'aplanation comme la VOP-CF. La rigidité carotidienne et les paramètres de remodelage artériels sont calculés à partir de mesures d'échographie vasculaire couplée à un ordinateur, technique appelée : échotracking à haute résolution. Dans la continuité, l'analyse de la déformation de la paroi peut être étudiée en post-traitement des données d'échotracking, et nous présenterons le logiciel développé par l'équipe de R. Lopata avec qui nous avons collaboré pour valider le logiciel in vivo. Nous présenterons également une technique laser doppler mesurant le remodelage des artéioles de la rétine, cependant pour des raisons techniques, les travaux avec cet appareil de mesure n'ont pas pu être poursuivis et ne seront donc pas intégrés à cette thèse. Les dosages plasmatiques de sorafenib et sunitinib ont été réalisés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) à détection UV-visible réalisés.

1. Protocole de l'étude clinique prospective observationnelle

L'ensemble de ce travail de recherche portant sur l'effet des AAD sur les propriétés élastiques des grosses artères a été réalisé dans le cadre d'une étude clinique prospective observationnelle dans le service d'oncologie de l'hôpital Cochin à Paris. Dans cette étude, des patients atteints de tumeur solide chez qui un traitement par AAD (sorafenib, sunitinib ou bevacizumab) était indiqué ont été inclus entre Octobre 2010 à Décembre 2013. Avant l'initiation du traitement, une évaluation pré-thérapeutique était réalisée dans le but de confirmer l'absence de contre-indication à la prise d'AAD et de déterminer la dose initiale adéquate. Les principales contre-indications à la prise d'AAD étaient un score « performance status » ≥ 3 selon l'ECOG qui permet de juger de l'état général du patient (124) (Eastern Cooperative Oncology Group), et/ou un haut risque thromboembolique ou hémorragique.

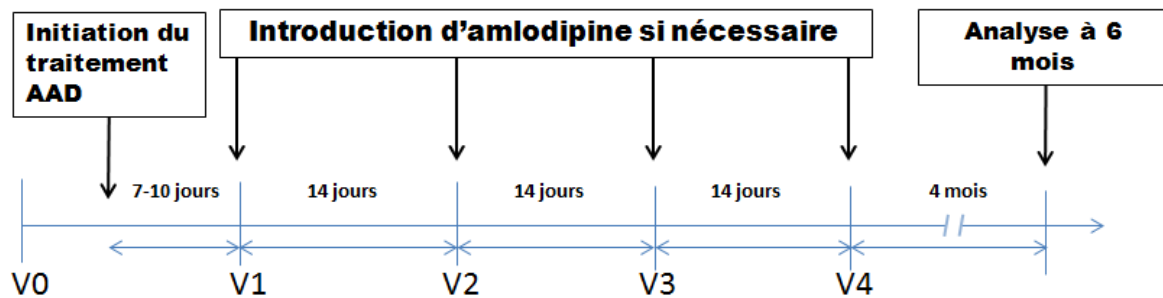
Le sunitinib était prescrit à 50mg une fois par jour pendant 4 semaines suivi de deux semaines de pause thérapeutique, l'ensemble de ces 6 semaines constituant un cycle, ou à 37.5mg par jour en continu. Le sorafenib était prescrit à 800 mg par jour en deux prises de 400mg chacune en dehors des repas.

Les mesures de pressions ont été réalisées en hôpital de jour lors des visites, et en auto-mesure par les patients eux-mêmes. En cas d'augmentation de pression au delà de 140/90 mmHg, un traitement antihypertenseur par amlodipine 5mg (Amlor®) pouvait être initié, selon les pratiques cliniques du service d'oncologie de l'hôpital Cochin. L'efficacité de l'amlodipine ayant été étudiée dans ce service, chez les patients traités pour une hypertension induite par le bevacizumab (Avastin®) (78)

Les mesures artérielles non-invasives ont été réalisées avant l'initiation du traitement antiangiogénique (V0), après 7 à 10 jours de traitement (V1) puis toutes les deux semaines pendant 6 semaines (V2 à V4) comprenant les mesures de pression centrale et de rigidité aortique par tonométrie d'aplanation et les mesure des propriétés de la paroi carotidienne par échotracking. Les doages plasmatiques sont effectués après l'initiation du traitement, de V1 à V4. Après 6 mois de suivi, les données de progression tumorale et de mortalité sont recueillies. La progression tumorale étant définie selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) (125) et les rapports d'examens cliniques. (figure16)

Un consentement lu et éclairé a été obtenu chez tous les patients, et cette étude a été réalisée dans le cadre du CERIA (Centre d'Etude et de Recherche des Inhibiteurs de l'Angiogénèse) et approuvée par le comité d'Etique de Cochin (N°12804766)

Figure 16. Schéma de l'étude clinique longitudinale

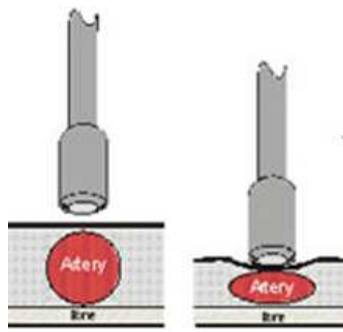


2. La tonométrie d'aplanation (SphygmoCor®)

2.1 Principe de la tonométrie d'aplanation

Les mesures de pression centrale, de rigidité artérielle et de quantification des ondes de réflexion peuvent être estimées de manière non-invasive. Le gold standard des mesures non-invasives de ces paramètres artériels est la tonométrie d'aplanation, qui se base sur le principe d'aplanation utilisé par les ophtalmologistes, selon lequel, la force nécessaire pour aplanir une surface donnée de l'artère est égale à la pression intra-artérielle (**figure 17**). L'enregistrement des courbes de pressions au cours du temps à différents sites artériels se fait à l'aide d'une sonde munie d'un quartz piézo-électrique (Millar®, USA) relié à un logiciel d'acquisition de pression SphygmoCor® (AtCor Medical, Australie) (**126,127**). La tonométrie d'aplanation permet d'estimer les pressions centrales en utilisant une fonction de transfert à partir des courbes de pressions enregistrées sur l'artère radiale, calibrée à partir des mesures de pression brachiales au sphygmomanomètre et de mesurer la rigidité artérielle aortique par l'enregistrement séquentiel des ondes de pressions au niveau de l'artère carotide commune droite et l'artère fémorale droite.

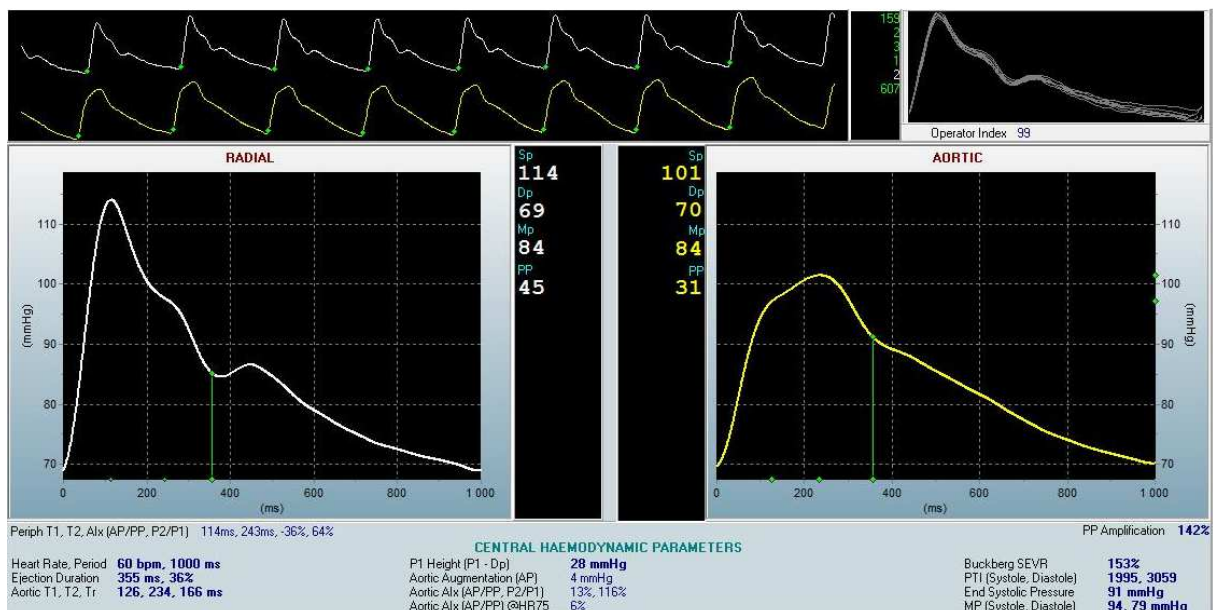
Figure 17. Principe de la tonométrie d'aplanation



2.2 Estimation des pressions artérielles centrales

L'approche la plus communément utilisée est d'enregistrer les courbes de pressions au cours du temps au niveau de l'artère radiale droite et d'ensuite appliquer une fonction de transfert pour calculer les courbes de pressions aortiques et ainsi déduire la pression artérielle systolique centrale et la pression pulsée centrale. (128,129) (Figure 18) La pression artérielle diastolique est acceptée comme étant la même au niveau central et au niveau périphérique.

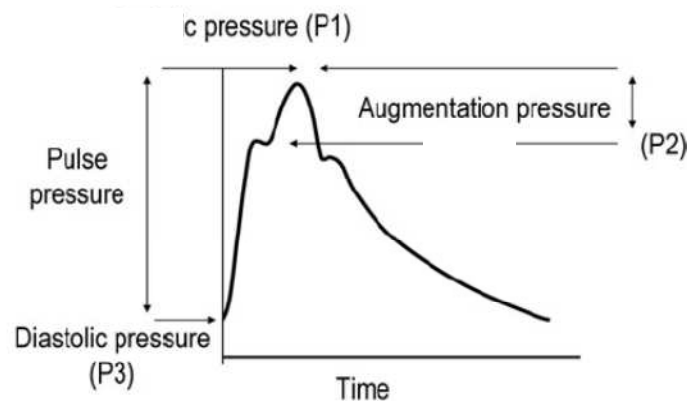
Figure 18. Représentation graphique du calcul des pressions centrales à partir des courbes de pressions au niveau de l'artère radiale par tonométrie d'aplanation



2.3 Quantification des ondes de réflexion

Comme décrit plus haut dans le chapitre 6.4 de l'état des connaissances, l'onde de pression est la somme de l'onde incidente générée par le ventricule gauche lors de sa contraction et de l'onde de réflexion générée au niveau des bifurcations principales (**Figure 19**). Plus les artères sont rigides et plus les ondes de réflexion arriveront tôt en systole, s'additionnant à l'onde incidente et augmentant ainsi la pression systolique. Ce phénomène peut être quantifié par le calcul de l'index d'augmentation (AIx), défini comme le rapport de l'augmentation de pression (AP) causée par le retour précoce de l'onde de réflexion en systole sur la pression pulsée (PP), exprimée en pourcentage : $AIx(\%) = AP/PP$. (**130**) Tout comme le calcul des pressions centrales, l'AIx est calculée à partir des courbes de pressions aortiques obtenue par la fonction de transfert depuis les courbes de pression radiales (**Figure 18**).

Figure 19. Représentation graphique de l'augmentation de pression générée par le retour précoce des ondes de réflexion. (130)



2.4 Mesure de la rigidité aortique

La rigidité aortique est estimée par la mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls le long de l'aorte thoraco-abdominale. La VOP est de manière générale mesurée par tonométrie d'aplanation en utilisant la méthode « foot-to-foot » sur l'enregistrement des ondes de pression couplé à un électrocardiogramme et le temps de transit mesuré entre les pieds d'ondes carotidienne et fémorale (Δt) (**Figure 20, Figure 21**) $VOP-CF = \Delta L / \Delta t$, où ΔL est la distance entre la carotide et la fémorale. La mesure de la distance entre la carotide et la fémorale doit être précise, néanmoins du fait d'une mesure en surface et des différentes morphologies, il est recommandé de multiplier la valeur de VOP obtenue par un facteur 0.8,

afin de se rapprocher au mieux des valeurs de longueurs de l'aorte mesurées en IRM. La formule devient alors : $VOP-CF=0.8x(\Delta t/\Delta L)$. (96,131)

Figure 20. Mesure de la vitesse de l'onde de pouls carotido-fémorale (VOP-CF) par la méthode « foot-to-foot »

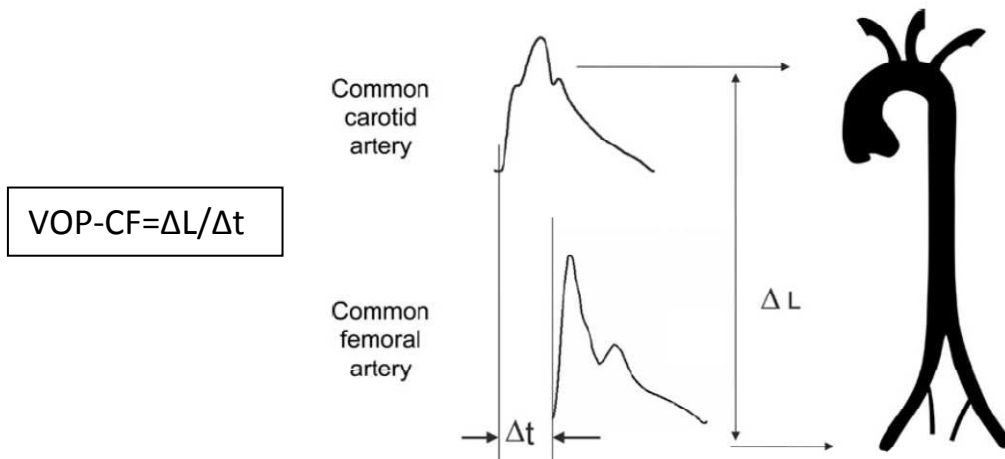
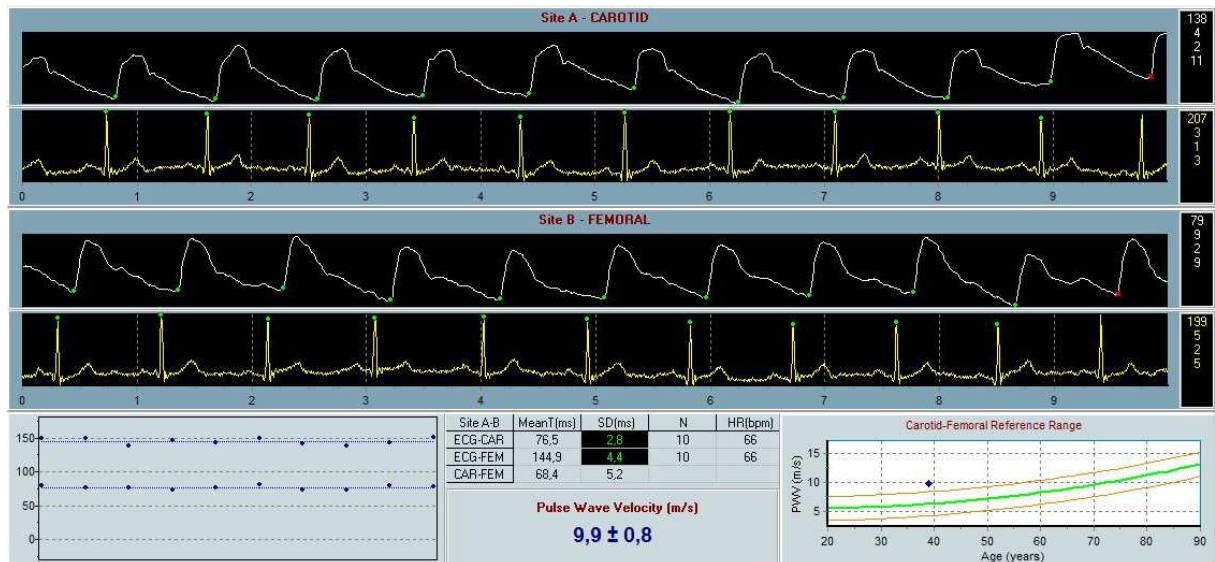


Figure 21. Représentation graphique de la mesure de la VOP carotido-fémorale.



3. Echotracking à haute résolution (Artlab®)

3.1 Principe de la technique d'échotracking

L'échographie est une technique qui permet d'examiner toutes les artères superficielles. L'étude de l'artère carotide commune (ACC) est un choix judicieux concernant l'évaluation des propriétés élastiques des grosses artères, en effet c'est une artère de gros calibre, élastique, facilement d'accès, sensible au vieillissement et aux variations de pression.

La mesure précise des variations de diamètre et de pression locale sont indispensables à l'évaluation des propriétés élastiques des grosses artères. Les pressions locales sont mesurées par tonométrie d'aplanation et les variations de diamètres au cours du cycle cardiaque par une méthode d'ultrasons. Le principe de l'échographie bidimensionnelle est basé sur les propriétés d'émission et de réflexion des ultrasons au niveau des interfaces de discontinuité d'impédance acoustique. Le signal réfléchi est capté et traduit en image. Le mode M pour « Motion » permet d'enregistrer le déplacement du vaisseau au cours du temps et ainsi mesurer l'expansion systolo-diastolique au cours du cycle cardiaque.

Le système Artlab® (Esaote, Italie) basé sur une technologie d'échotracking à haute résolution (WallTrack system®), incluant l'utilisation d'une sonde multibarrette de 128 lignes radiofréquence (RF) permet d'allier la précision de la technologie d'échotracking et la prise en compte du segment artériel entier. (132,133)

3.2 Evaluation des propriétés élastiques de l'artère carotide commune

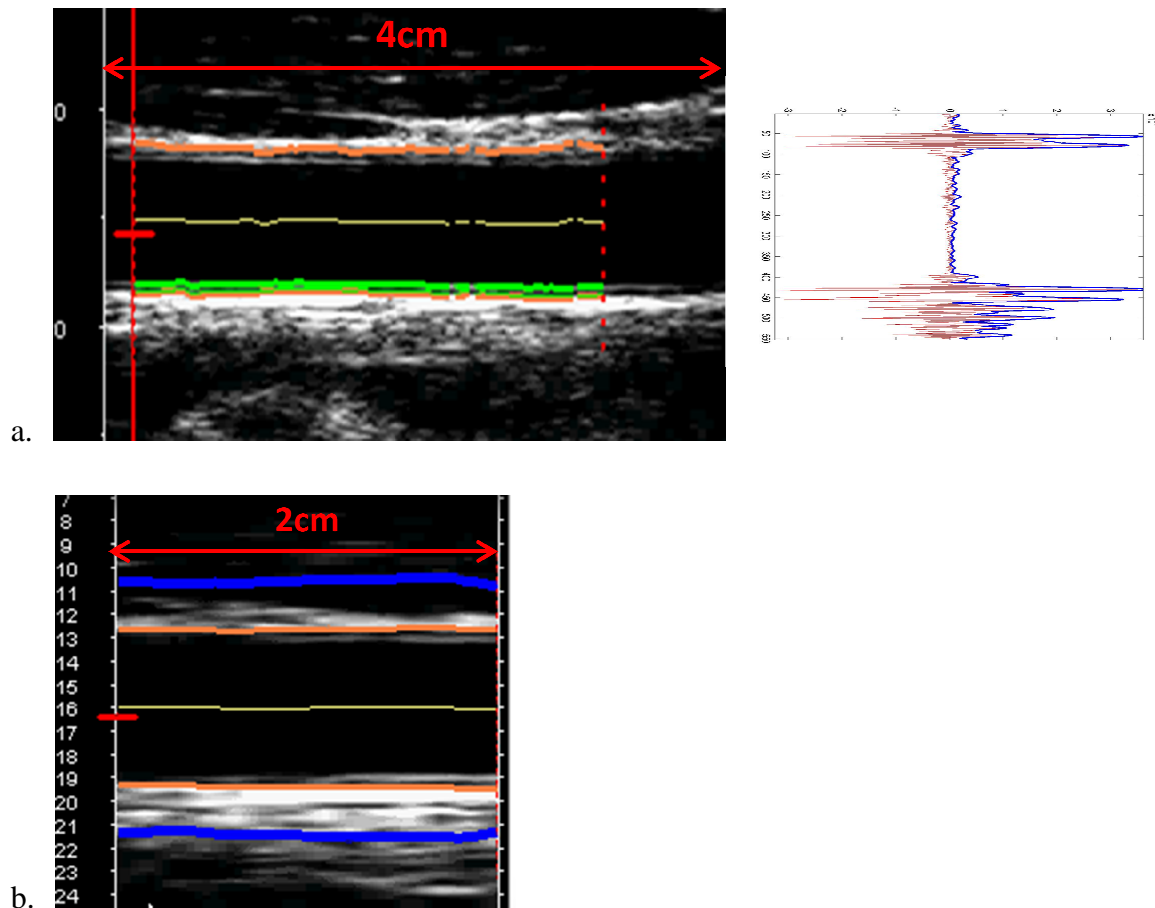
Cette nouvelle technologie donne accès à tous les paramètres mécaniques sur 4cm de segment artériel (134). Le mode d'acquisition bidimensionnel (BM) permet de mesurer le diamètre externe et l'épaisseur intima-média (IMT) avec une résolution de 21µm à chacun des 128 sites du segment de 4cm de l'ACC pendant 6 secondes (fréquence 30Hz). Le mode de détection de mouvement (FBM) permet de mesurer le diamètre externe et la distension (Ds-Dd où Ds est le diamètre systolique et Dd le diamètre diastolique) avec une résolution de 1.7µm à chacun des 14 sites du segment de 2 cm de l'ACC pendant 6 secondes (fréquence 600Hz). (figure 22) (135,136)

A partir de ces paramètres mesurés en BM et FBM, une analyse plus fine de la mécanique peut être réalisée par le calcul de plusieurs paramètres artériels tels que : le diamètre interne (Dint), la surface cross-sectionnelle (cwsa), le rapport épaisseur sur rayon (h/r), la compliance

(comp), le module élastique de Young (E_{inc}) et la contrainte circonférentielle (σ). La distensibilité (Dist) est calculée à partir de la formule suivante $Dist = \Delta A / (A \cdot \Delta P)$, où A est l'aire luminale diastolique, ΔA est la variation de l'aire luminale au cours d'un battement cardiaque, et ΔP est la pression pulsée carotidienne mesurée par tonométrie d'aplanation. La distensibilité carotidienne est convertie en rigidité carotidienne (Cstiff) à partir de la formule de Bramwell-Hill, $PWV = (PP \times A / \Delta A)^{1/2}$, ce qui donne $Cstiff = (Cdist)^{-1/2} (m \cdot s^{-1})$. (137)

Figure 22. Images échographiques de l'artère carotide commune

(a) en mode bidimensionnel (BM) avec à gauche, en vert l'IMT et entre les deux lignes oranges le diamètres externe sur un segment artériel de 4cm et à droite le tracé radiofréquence (b) en mode de détection de mouvement (FBM), avec en bleu la distension sur un segment artériel de 2cm.



3.3 Mesure de la déformation de la paroi au cours du cycle cardiaque

L'étude de la dynamique et de la géométrie de la paroi artérielle est un domaine en pleine recherche, essentiellement dans l'étude de la caractérisation des plaques d'athérome

(vulnérable ou stable) dans l'évaluation du risque d'accident vasculaire cérébrale. Dans le cadre de ce travail de recherche, il n'est pas question d'étudier la plaque d'athérome mais d'étudier les modifications de la déformation de la paroi carotidienne que pourraient induire les traitements antiangiogéniques. L'étude de la déformation de la paroi artérielle peut être étudiée à partir des données d'échotraking de l'ACC à l'aide d'un logiciel développé par Richard Lopata et son équipe à Eindhoven aux Pays-Bas. Ce logiciel permet d'étudier en 2D et en 3D le strain au cours d'un cycle cardiaque. L'intérêt de l'échotracking est qu'on a une bonne résolution spatiale et temporelle et que cette technique est moins cher que d'autres techniques telles que l'IRM et l'angiographie. Dans cette partie je ne détaillerai que la méthode d'analyse du strain en 2D à partir des données d'échotracking qui a été validée in vitro.

- Segmentation

Pour étudier la géométrie de l'artère, une segmentation automatique des données d'échotracking est nécessaire. La segmentation des données dynamiques de radiofréquences sont réalisées en fin de systole, utilisant la méthode de segmentation automatique décrite par **(138)**. Pour faire court, la segmentation est réalisée sur la section longitudinale de l'artère en utilisant un filtre « sustain attack » (SAF) qui permet de définir les parois antérieure et postérieure **(139)**. Le SAF est basé sur la génération d'un signal de référence qui piste l'enveloppe du signal radiofréquence. Il permet de détecter les parois lumenales antérieure et postérieure (diamètre interne) **(figure 23)**. Le filtre a une précision de 1.3% pour la mesure du diamètre interne avec un biais de 150 μ m. La paroi antérieure est plus difficile à détecter du fait d'une forte réflexion au niveau de la paroi postérieure générant des artéfacts. Une délimitation manuelle est alors nécessaire. Le SAF après avoir détecté les parois internes, délimite de manière automatique les parois externes pour une épaisseur uniforme sur l'ensemble de la paroi de 1mm. Cette première délimitation est ensuite égalisée en appliquant une fonction harmonique de deuxième ordre qui permet d'éliminer les points aberrants. **(Figure 24)**

Cette segmentation sert de base pour le pistage d'environ 16 à 18 points et l'estimation du strain de la paroi artérielle au cours du cycle cardiaque.

Figure 23. Délimitation de la paroi antérieure et postérieure luminale de l'ACC par le filtre SAF.

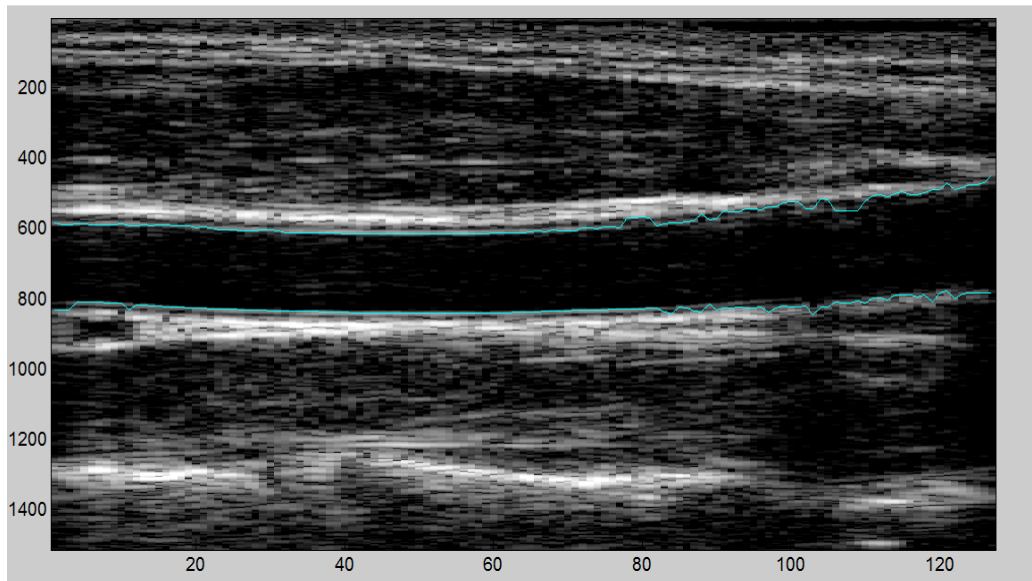
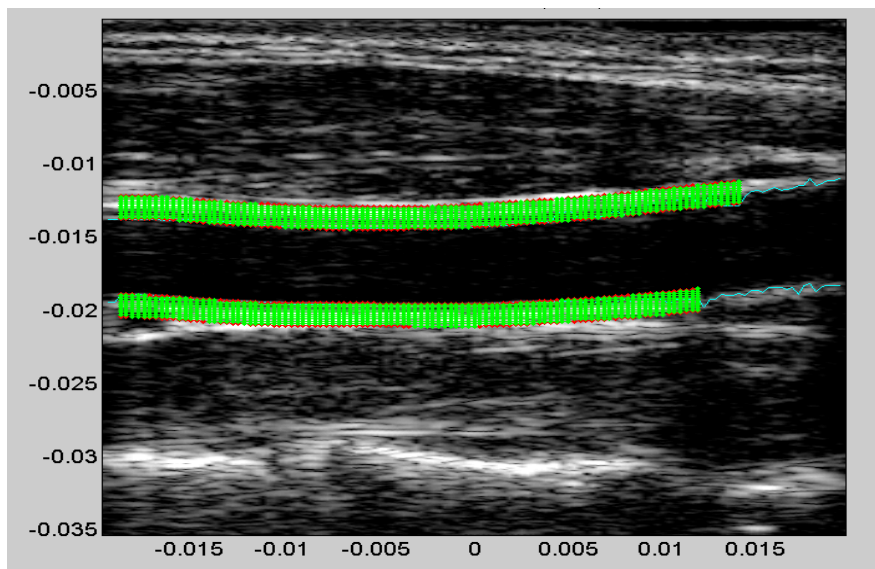


Figure 24. Délimitation de la paroi antérieure et postérieure par le filtre SAF.



- Analyse de la déformation de la paroi

La mesure 2D de la déformation de la paroi se fait à l'aide d'un algorithme appliqué aux données de radiofréquence enregistrées en mode bidimensionnel. Les déformations locales sont déterminées par corrélation croisée des fenêtres 2D composées de plusieurs lignes de données de radiofréquences enregistrées au cours du temps (**figure 25**). Les déplacements sont estimés à partir d'une méthode d'affinage décrite par (**140,141**). Les déplacements sont

estimés en deux itérations : dans la première itération, en utilisant l'enveloppe du signal radiofréquence, un déplacement grossier est estimé, ensuite le déplacement estimé est affiné dans une deuxième itération en utilisant une plus petite fenêtre de signaux radiofréquences et en se basant sur le déplacement grossier estimé au préalable. Cette méthode permet la mesure robuste du déplacement de structures dans un premier temps et une estimation précise, de haute résolution de la déformation locale dans un deuxième temps.

Le déplacement au cours du temps permet de suivre la paroi du vaisseau, ce qui permet de calculer la déformation axiale différentielle image après image. Dans la représentation graphique de la déformation de la paroi, la déformation compressive radiale (positive) a pour code couleur le jaune, alors que la déformation extensive radiale (négative) a pour code couleur le violet. **(figure 26)**

La déformation de la paroi qui nous intéresse est celle en systole, moment où les forces d'étirement sont les plus élevées. Les parois antérieure et postérieure de l'artère sont divisées en trois segments ($shell_{ant}$ 1, 2 et 3 et $shell_{post}$ 1, 2 et 3) d'une épaisseur de $333\mu m$ chacun. Dans chaque shell, 3 points seront pisté image après image. Il se peut que dans le shell 3, il n'y ait que deux points. Le total de point pisté par ligne radiofréquence variant donc de 16 à 18 points. L'épaisseur de la paroi antérieure ou postérieure étant prédéfinie par le SAF à 1mm pour toutes les mesures. Les antiangiogéniques induisant des modifications de pression artérielle, dans le but de comparer plusieurs visites chez le même patient, la déformation de la paroi calculée pour chacune des shell est ajustée à la pression pulsée carotidienne obtenue par tonométrie d'aplanation. **(142)**

Le strain longitudinal n'est pas analysé car on assume qu'il est négligeable. Peu de données sont disponibles concernant le déplacement et la déformation de la paroi dans le sens longitudinal. L'algorithme de segmentation et l'algorithme d'analyse du strain sont effectués avec le logiciel MATLAB R2014

Figure 25. Fenêtre 2D composée de plusieurs lignes de signal radiofréquence avec des points définis qui seront pistés image après image pour la mesure du déplacement.

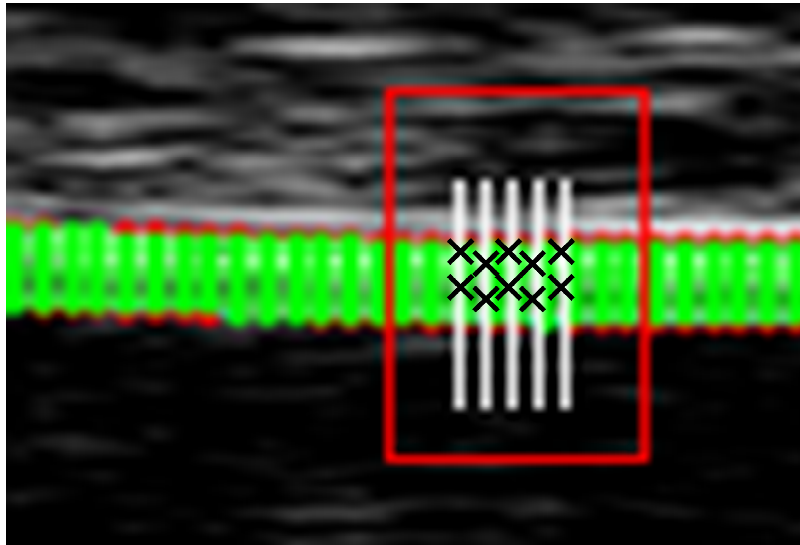
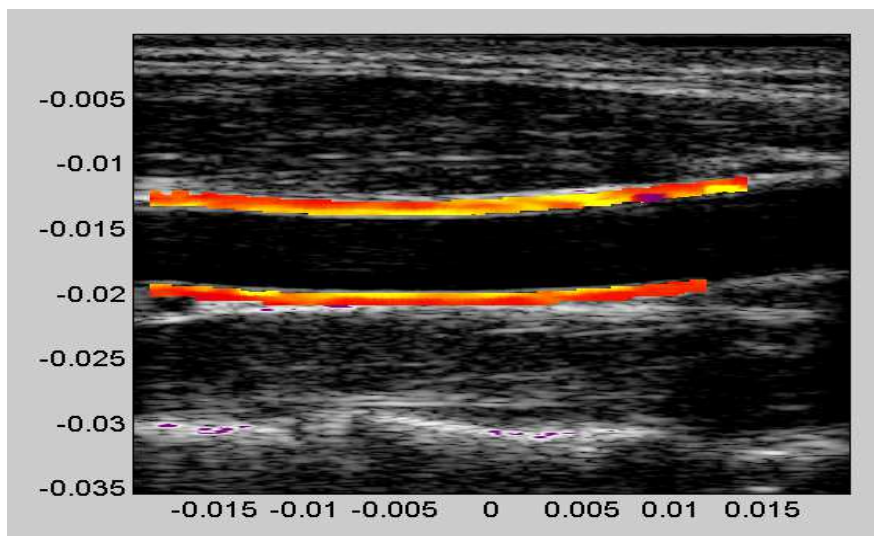


Figure 26. Représentation graphique du strain à un temps t du cycle cardiaque. Le jaune représentant la déformation compressive et le rouge ou violet la déformation extensive.



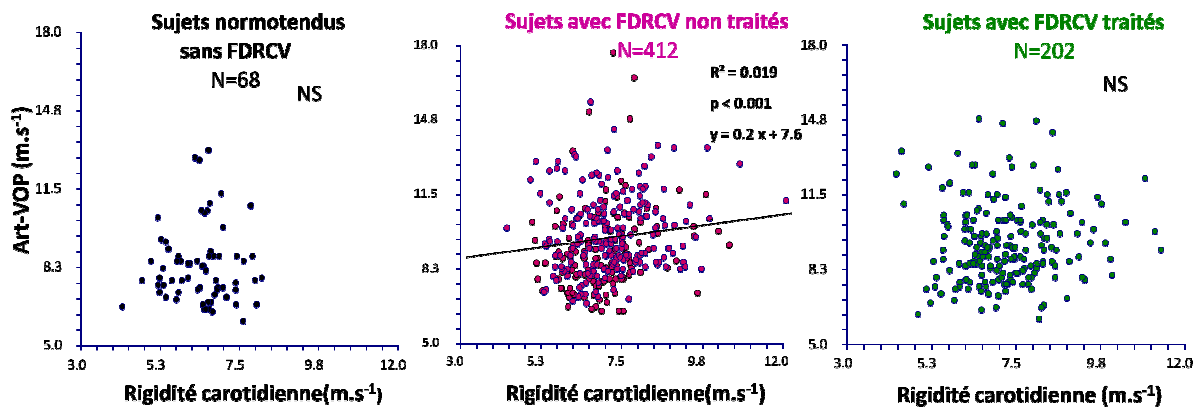
4. Validation de l'appareil Arteriograph® pour la mesure de la rigidité aortique

Article 1: *SINGLE POINT MEASUREMENT OF PWV WITH ARTERIOGRAPH® ®: WHICH ARTERIAL PATHWAY?*

En cours de soumission

Ces dix dernières années, de nouveaux appareils de mesure non-invasive de la rigidité artérielle sont arrivés sur le marché. Le but étant d'être moins cher et plus facile d'utilisation tout en étant reproductible et précis. Avant et après la mise sur le marché, ces appareils sont comparés à d'autres appareils validés, faisant figure de gold standard. Pour la mesure de la rigidité aortique, les deux principaux appareils utilisés comme gold standard sont le SphygmoCor® présenté précédemment et le Complior®, qui utilise une technique piézo-électrique enregistrant les ondes de pression de manière simultanée au niveau de l'artère carotide et de l'artère fémorale. Notre laboratoire est sollicité par les entreprises développant de nouveaux appareils de mesure de la rigidité artérielle afin que nous les validions de manière indépendante. Dans ce but, la société Tensiomed© a sollicité nos services pour valider un appareil de mesure de la rigidité artérielle : l'Arteriograph®. Cet appareil utilise une technique oscillométrique à l'aide d'un brassard qui enregistre les variations de pressions. Dans un premier travail j'ai comparé la mesure de rigidité de l'Arteriograph® à la rigidité carotidienne calculée à partir des mesures d'echotracking présentée précédemment, chez des sujets âgés de 50 à 75 ans (**Figure 27**) sans trouver de corrélation entre ces deux mesures. Ce résultat est d'autant plus surprenant que précédemment Paini et al. (**137**) avaient montré qu'il y avait une corrélation entre la rigidité carotidienne et le VOP-CF et que cette corrélation diminuait avec le nombre de facteur de risque cardiovasculaire, mettant en évidence des déterminants influençant de manière différente la rigidité aortique et la rigidité carotidienne.

Figure 27. Comparaison entre la rigidité carotidienne et la mesure de rigidité mesurée avec l'Artériograph dans une population de 50 à 75 ans : (de gauche à droite) chez des sujets sains, des sujets non traités pour leur facteur de risque cardiovasculaire (FDRCV) et chez des sujets traités pour leur FDRCV.



Afin de faire la lumière sur ce que mesure l'Arteriograph®, nous avons mis en place une étude clinique ayant pour but de comparer la mesure de rigidité de l'Arteriograph® aux mesures de rigidité des grosses artères élastiques telles que l'aorte et la carotide et aux mesures de rigidité des artères musculaires telles que les artères du bras.

Dans cette étude transversale, 90 patients ont été inclus, 30 sujets contrôles sans facteurs cardiovasculaires et 60 patients hypertendus traités. La mesure de rigidité déterminée par l'Arteriograph® a été comparée à la rigidité des artères élastiques par la mesure de la VOP-CF par tonométrie d'aplanation et la rigidité carotidienne mesurée par échotracking. Puis la mesure de l'Arteriograph® a été comparé à la rigidité des artères musculaires du bras par la mesure de la VOP carotido-radiale, la VOP carotido-humérale et la rigidité humérale. Nous montrons qu'il y a bien une corrélation entre la mesure de rigidité de l'Arteriograph® et la rigidité carotido-fémorale de même qu'avec la rigidité carotidienne, mais pas de corrélation avec la rigidité des artères musculaires. Nous observons que les déterminants de la rigidité mesurée par l'Arteriograph® sont les mêmes facteurs qui influencent la rigidité carotido-fémorale et ce dans les mêmes proportions. Néanmoins la mesure de la rigidité par l'Arteriograph® est également influencée par le sexe, facteur que l'on retrouve dans l'étude des déterminants expliquant la différence entre les deux mesures.

Nous confirmons que l'Arteriograph® mesure plus une rigidité d'artères élastiques plutôt qu'une rigidité d'artères musculaires. Néanmoins la mesure de la rigidité par l'Arteriograph® semble de moins en moins précise avec l'augmentation du nombre de risques cardiovasculaires, et semble surestimée. Des ajustements doivent être faits pour pallier l'influence de ces paramètres afin de valider définitivement l'Arteriograph® pour la mesure de la rigidité aortique.

Ce travail de validation avait pour but d'utiliser l'Arteriograph® dans l'étude longitudinale dans le cancer pour l'évaluation de la rigidité aortique. A la vue des résultats, sachant que les sujets atteints de cancer constituent une population très peu investiguée dans l'étude des paramètres artériels, nous avons préféré utiliser une technique déjà validée et largement utilisée telle que la tonométrie d'aplanation pour l'évaluation des pressions centrales et de la rigidité aortique

Single point measurement of PWV with Arteriograph®: which arterial pathway?

Maureen Alivon^{1,2,3,4}

Erwan Bozec, PhD^{1,2,3,4}

Stéphane Laurent, MD^{1,2,3,4}

Pierre Boutouyrie, MD^{1,2,3,4}

Affiliations :

- (1) Université Paris Descartes ;
- (2) INSERM U970, Paris, France ;
- (3) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris ;
- (4) Department of Pharmacology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France ;

Word count: Abstract: 263 words; Word count (whole manuscript 5535): Text proper 3758 words and 31 references + 4 tables, 4 figures.

Keywords: pulse wave velocity, elastic arteries stiffness, muscular arteries stiffness, hypertension, oscillometric method

Corresponding author and reprint address:

Prof. Pierre BOUTOUYRIE

Department of Pharmacology and INSERM U970

Hôpital Européen Georges Pompidou

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris

Université Paris Descartes

56, rue Leblanc, 75015 Paris, France

tel 00 33 1 56 09 39 91

fax 00 33 1 56 09 39 92

e-mail: pierre.boutouyrie@egp.aphp.fr

ABSTRACT

Introduction: Large artery stiffness is recognized as a strong independent marker of cardiovascular risk, mainly through aortic pulse wave velocity (PWV). Arteriograph® is a non-invasive oscillometric device which estimates aortic PWV through brachial pressure wave analysis.

Aim: To compare PWV measured with Arteriograph® (Art-PWV) to arterial stiffness from different segments of the arterial tree. To study the determinants of Art-PWV and of carotid-to-femoral PWV (CF-PWV) and the determinants of discrepancies between the two measurements.

Methods: CF-PWV, carotid-to-radial PWV (CR-PWV) and carotid-to brachial PWV (CB-PWV) were assessed by aplanation tonometry (SphygmoCor®), Art-PWV was assessed with Arteriograph® and carotid and brachial stiffness (CS and BS) were assessed by high resolution echotracking (Artlab®). Pearson's coefficient (R^2) was performed to study correlations between techniques and robust multivariate analysis and stepwise regression to study the determinants.

Results: In a cross-sectional study, 90 subjects were included: 30 healthy subjects and 60 patients with essential hypertension. Art-PWV was correlated to CF-PWV in all patients and healthy controls ($r=0.55$ and $r=0.68$ $p<0.001$) but not in hypertensive patients and ($r=0.24$, $p=0.061$). Correlation with CS was found in all groups ($r=0.68$, 0.59 and 0.46 , $p<0.001$). But there was no correlation with BS, CR-PWV and CB-PWV. Determinants of CF-PWV were brachial pulse pressure (bPP), age and distance between carotid and femoral arteries. Art-PWV determinants were similar: age, bPP, distance between jugulum and public symphysis ($\text{distance}_{\text{Jug-Symp}}$) and gender (incremental $R^2 = 0.23$, 0.07 , 0.07 and 0.04 respectively, $P<0.05$). Determinants of discrepancies between CF-PWV and Art-PWV were: age, $\text{distance}_{\text{Jug-Sphymp}}$ and gender (incremental $R^2=0.23$, 0.21 and 0.14 respectively, $P<0.05$). Determinants of discrepancies between Arteriograph® time delay and CF time delay (Art- Δt and CF- Δt) were age and gender (incremental $R^2=0.13$ and 0.12 respectively, $P<0.05$).

Conclusion: Arteriograph® was well correlated to elastic arteries stiffness and determinants of Art-PWV and CF-PWV were similar. Nevertheless, Arteriograph® seemed to be less accurate in patient with increasing cardiovascular risk factors and might be overestimated. Adjustments may have to be done.

INTRODUCTION

In the last decades large artery stiffness has been a center of interest in the development of cardiovascular diseases. The 2007 ESC and ESH guidelines formally recognize arterial stiffness as an indicator of organ damage **(1)**. It has been proved that aortic PWV is a strong independent predictor of outcome in a variety of populations: in coronary heart disease **(2)**, in elderly **(3-4)**, in end-stage renal disease **(5)**, in diabetes mellitus **(6)**, in hypertension **(7-9)** and in the general population. **(10)**

Arterial stiffness can be measured with non-invasive techniques, regionally through the measurement of carotid to femoral pulse wave velocity (CF-PWV) by aplanation tonometry, but also locally on common carotid artery (CCA) or brachial artery by high resolution echotracking. Many non-invasive devices have been developed to estimate aortic stiffness. An expert consensus document on arterial stiffness has been published and provided an updated and practical overview of the most relevant methodological aspects and clinical applications in measurement of arterial stiffness. **(11)**

Recently a new device has been introduced onto the market: the Arteriograph® using an oscillometric method, with a simple upper arm cuff. Many teams have been working on the Arteriograph® to validate this technique for the measurement of aortic PWV. It has been compared to several devices using aplanation tonometry and piezoelectric methods and there is still a controversy in the literature concerning the measurement of aortic PWV by the Arteriograph® (Art-PWV), especially since Trachet et al. demonstrated that the Arteriograph® measured brachial stiffness instead of aortic stiffness, using a numerical model of the arterial tree. **(12)**

The objective of the study is to make the light on what the Arteriograph® really measures with a clinical study, by comparing Art-PWV to central and brachial arterial stiffness through the measurement of aortic CF-PWV, carotid to radial PWV (CR-PWV) and carotid to brachial PWV (CH-PWV) assessed by aplanation tonometry and local carotid and brachial stiffness assessed by high resolution echotracking. We aimed to identify and to compare the determinants of CF-PWV and Art-PWV and study the determinants of discrepancies between CF-PWV and Art-PWV and between the time delay of the pulse wave needed to calculate CF-PWV and Art-PWV (Art- Δt and CF- Δt).

MATERIAL AND METHODS

Subject and study design

In a cross-sectional study, 90 subjects from the Hypertension Department at Georges Pompidou European Hospital in Paris were recruited, divided into two groups: 30 healthy controls and 60 treated hypertensive subjects with or without diabetes or metabolic syndrome. All patients underwent common carotid stiffness (CS) and CF-PWV, and in a subgroup, 63 underwent CR-PWV, CH-PWV and brachial stiffness (30 healthy controls and 33 hypertensive patients). Demographic data with details of cardiovascular (CV) risk factors, family history of hypertension and/or diabetes mellitus, and treatment were collected during standardized clinical workup on the day of the arterial measurements. Essential hypertension was defined in patients as a systolic blood pressure (SBP) ≥ 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 mm Hg or treated with anti-hypertensive drugs. Any cause of secondary hypertension was eliminated. Subjects under 18 years old were not included as well. The protocol was conducted according to the guidelines of the national ethical committee. Regional PWV were performed by aplanation tonometry with SphygmoCor®, local arterial stiffness was performed by high resolution echotracking with Artlab® and Art-PWV was measured with Arteriograph®.

Non-invasive arterial investigation

Aplanation tonometry: SphygmoCor®

The non invasive investigation was performed in a room at $22\pm 1^\circ\text{C}$ dedicated to echography. Brachial BP was measured with an oscillometric device (Colin BP8800®) after at least 10 minutes recumbent in supine position. Six measurements were recorded and the mean of the six measurements were calculated for SBP, DBP and mean BP (MBP). Brachial pulse pressure (bPP) was calculated as the difference between SBP and DBP.

Aortic BP and regional PWV were performed by aplanation tonometry. Aortic pressure waveform was determined from the radial artery waveform using a transfer function (13) and calibrated against an oscillometric brachial BP (Colin BP8800®) according to international Guidelines (11). Aortic stiffness was estimated by the measurement of the CF-PWV and was recorded along the descending thoracoabdominal aorta by the foot-to-foot velocity method, as previously published and validated. (14) Briefly, waveforms were obtained transcutaneously over the right CCA and femoral artery, and the time delay (Δt) was measured between the feet of two waveforms according to ECG signals at both sites. The distance (D) covered by the waves was established as the distance between the two recording sites. Thus the PWV was adjusted to a factor 0.8 according to the guidelines. (15,16) PWV was calculated as $PWV = 0.8 \times D \text{ (m)} / \Delta t \text{ (s)}$. We applied the same principle for the measurement of carotid to radial-PWV (CR PWV) and carotid to brachial-PWV (CH PWV), we subtracted the distance between the carotid and the sternal notch from the distance between the carotid and the radial arteries and from the distance between carotid and brachial arteries:

$$CR\text{-PWV} = (D_{\text{carotid-radial}} - D_{\text{carotid-sternal notch}}) / \Delta t \text{ (m/s)}$$

$$CH\text{-PWV} = (D_{\text{carotid-brachial}} - D_{\text{carotid-sternal notch}}) / \Delta t \text{ (m/s)}.$$

High resolution echotracking: Artlab®

Local arterial stiffness was performed with a novel system (Mylab®, Esaote, Italy) based on high-resolution echotracking technology (Artlab®) including the use of a 128 RF line multiarray. (17)

This novel technology gives access to all major mechanical parameters for 4cm arterial segment in real time. Using the bidimensional acquisition mode, intima-media thickness (IMT) and external diameter measurements were obtained with a 21µm resolution at each of

the 128 sites of a 4cm long CCA segment. The arterial wall motion acquisition mode provided distension ($D_s - D_d$, where D_s is systolic internal diameter and D_d , diastolic internal diameter) with a 1.7um spatial resolution at each of the 14 sites of a 2cm-long CCA segment. **(18, 19)** Carotid distensibility (C_{dist}) was estimated, assuming the lumen to be circular, through the variations in arterial cross sectional area and BP during systole as described previously. **(20)** C_{dist} was calculated as $\Delta A / (A - \Delta P)$ where A is the diastolic lumen area; ΔA is the stroke change in lumen area and ΔP is local PP, measured by aplanation tonometry. We converted this into carotid stiffness (CS) by using the Bramwell-Hill equation, $PWV = (PP * A / \Delta A)^{1/2}$, which gives $CS = (C_{dist})^{-1/2} (m.s^{-1})$. **(21)**

Oscillometric method: Arteriograph®

The Arteriograph® used an entirely novel method to determine PWV by analysis of the oscillometric pressure curves registered on the upper arm. The principle of the oscillometric method was based on plethysmography and registered pulsatile pressure changes in an artery. The Arteriograph® initially measured the BP in the upper arm oscillometrically and afterwards produced a cuff pressure over the brachial artery that is 35mmHg in excess of the SBP measured. **(22)** The pressure in the underlying occluded artery was transmitted through the cuff to the pressure sensor and was reported to show multiple peaks. The first was the systolic peak, corresponding to the ejection of blood from the left ventricle into the aorta, while the second peak was assumed to originate from reflection of the first pressure wave in the lower body. The time difference between the first and the second wave in the pressure signal was used as the return time Δt (i.e., the time needed for the pressure wave to travel from the aortic arch to its reflection point and return, with the iliac bifurcation assumed to be the dominant reflection point). The traveled distance corresponding to this return time was twice the distance from aortic arch to iliac bifurcation, which was approximated by measuring the distance between jugulum and symphysis externally ($Distance_{Jug-Symp}$). **(12)**

$$\text{Art-PWV} = 2 \times \text{Distance}_{\text{Jug-Symp}} / \Delta t$$

Data analysis

Patients characteristics are given as mean \pm standard deviation (SD) or proportion of participants in percentage. We used a *t*-test to detect differences between groups for baseline quantitative variables. We used a linear regression to evaluate the associations between Art-PWV and local and regional stiffness. All of the independent parameters showing significant correlations with Art-PWV or CF-PWV were integrated into a robust multiple stepwise regression analysis. This allowed us to determine parameters significantly and independently correlated with either Art-PWV or CF-PWV. We carried out this analysis in the entire population. We identified factors differentially affecting Art-PWV and CF-PWV using the residual of the correlation between Art-PWV and CF-PWV and the factors differentially affecting the time delays Art- Δt and CF- Δt using the residual of the correlation between Art- Δt and CF- Δt . Statistical analysis was carried out using NCSS 2004 package software (Hintze JL). Statistical significance was reached for $P < 0.05$.

RESULTS

Study population

From September 2010 to March 2012, 90 patients were included in this cross-sectional study, divided into two groups: 30 healthy controls and 60 treated hypertensive subjects with or without diabetes or metabolic syndrome. All patients underwent common carotid stiffness (CS) and CF-PWV, and 63 underwent CR-PWV, CH-PWV and brachial stiffness (30 healthy controls and a subgroup of 33 hypertensive patients). The characteristics of the two groups are described in **table 1** and **table 2**. Hypertensive subjects were older than healthy controls. The two groups were comparable for sex, weight, height and body mass index (BMI). By definition, hypertensive subjects had significantly higher BP values than healthy controls, either central or peripheral. CF-PWV and CS were significantly higher in hypertensive patients, while brachial PWV and brachial stiffness were comparable. Hypertensive subjects had higher carotid external diameter, intima media thickness, and a lower distension than healthy subjects.

All hypertensive subjects received lowering blood pressure treatment; most of them received at least one system rennin-angiotensin antagonist. Half of hypertensive subjects had hypercholesterolemia and were smokers (current or past).

Comparison between Arteriograph® PWV and central elastic arteries stiffness

We observed a significant positive correlation between Art-PWV and CF-PWV when we considered the entire population ($R^2=0.30$; $P<0.001$) and healthy controls ($R^2=0.46$; $P<0.001$). But the correlation was lost in hypertensive subjects ($R^2=0.06$, NS) (**Figure 1, table 3**). Bland-Altman comparison showed acceptable accuracy (**Figure 2**); mean of the difference between the methods was 0.5 ± 2.2 m/s and 3 of the 90 paired differences (3.3%) fall outside the $\pm 2SD$ boundary of the mean difference. We also observed a bias, indeed, differences

between the two methods was increased in high values. Correlation between mean of PWV from the two techniques and difference between the two techniques was significant in all subjects and in hypertensive patients ($R^2 = 0.13$ and 0.16 respectively, $P < 0.001$) while there was no bias in healthy controls (**Table 4**).

Similar results were obtained when we compared Art-PWV with carotid stiffness (CS). Art-PWV and CS were positively correlated in all subjects ($R^2=0.46$; $P < 0.001$), in healthy controls ($R^2=0.35$; $P=0.003$) and in hypertensive patients ($R^2=0.21$; $P < 0.001$). Bland-Altman analysis was a little less accurate: mean of differences was -1.5 ± 1.7 m/s meaning that Art-PWV is overestimated in comparison with CS and 8.5% of the 59 paired differences fall outside the $\pm 2SD$ boundary of the mean of the difference between the two techniques. There was also a bias in higher values in all subjects and in hypertensive patients ($R^2 = 0.07$ for both, $P=0.01$) but not in healthy controls (**table 4**).

Comparison between Arteriograph® PWV and brachial muscular arteries stiffness

We compared Art-PWV to brachial PWV (carotid-to-radial PWV and carotid-to-brachial PWV) and local brachial stiffness in 59 subjects from the initial population divided onto the 30 healthy controls and a subgroup of 33 treated hypertensive subjects. There was no correlation between Art-PWV and brachial pulse wave velocity when we compared Art-PWV and CH-PWV in all subjects, in healthy controls and in hypertensive patients ($R^2=0.04$, 0.06 and 0.00 respectively, NS). There was no correlation between Art-PWV and CR-PWV in all subjects and in hypertensive patients ($R^2=0.00$ and 0.08 respectively, NS) but there was a correlation in healthy controls ($R^2=0.16$, $P=0.026$). Same thing when we compared Art-PWV to local brachial stiffness, no correlation was found in all subjects, either in healthy controls and hypertensive patients ($R^2=0.00$, 0.03 and 0.08 respectively, NS). (Table 3)

Determinants of Art-PWV, CF-PWV and discrepancies

In a univariate regression analysis we found that the following parameters were significantly correlated to CF-PWV and Art-PWV: brachial PP (bPP), aortic SBP, age, gender, distance_{Jug-Symp}, carotid-to-femoral distance, diabetic status and hypercholesterolemia status. Using a multivariate model of stepwise regression analysis we found that age, bPP and carotid-to-femoral distance were independent determinants of CF-PWV explaining 42% of the variance; the higher blood pressure, the older the patient or the higher the distance between carotid and femoral arteries, the higher the CF-PWV. We found similar independent determinants of Art-PWV: age, distance_{Jug-Symp} and gender explaining 39% of the variance. Women were associated with a lower Art-PWV than men. (**Table 5**). Determinants of discrepancies between the two measurements were almost the same determinants of Art-PWV, meaning age, gender and distance_{Jug-Symp} explaining a large part (61%) of the differences between the two measurements.

Determinants of Arteriograph® Δt , carotid-to-femoral Δt and discrepancies

Art-PWV and CF-PWV was calculated from the distance between two sites measured manually by the operator and the time delay which is the time needed for the pressure wave two travel between the two sites directly measurement by the device. To investigate further the determinants of the PWV assessed by the two techniques, we studied the determinants of the time delay measured by the Arteriograph® (Art- Δt), the carotid-to-femoral Δt (CF- Δt) and the determinants of discrepancies of both measurements. We entered in the models the same parameters than for the PWV except the distances.

The determinants of CF- Δt were age and bPP, explaining 40% of the variance; the higher the pulse pressure or the older the subject, the lower the time delay, meaning the higher the CF-PWV. Determinants of the Art- Δt were bPP, age and gender explaining 40% of variance as well. And the determinants of discrepancies between the two measurements were age, and gender. (Table 6)

DISCUSSION

The principal finding of our study was that Art-PWV was more correlated to elastic arterial stiffness than muscular arterial stiffness. The second finding was that determinants of Art-PWV and CF-PWV were similar.

Art-PWV was as well correlated to regional aortic PWV as to local carotid stiffness but not to muscular arterial stiffness. Nevertheless, we observed a loss of the correlation between CF-PWV and Art-PWV in hypertensive subjects, when the correlation was strong in healthy subjects. This loss of correlation could be explained by the fact that the measurement of PWV by Arteriograph® is based on the calculation of a transit time on a second peak in the pressure signal of the over-inflated brachial cuff. In hypertensive subjects, arterial stiffness is high and the wave reflection comes back faster to the heart, leading to a short transit time between the early and the late systolic peak. In case of high aortic stiffness, the Arteriograph® might not be accurate to determine properly the early and the late systolic peak, therefore the transit time needed for the calculation of Art-PWV. This could explain the differences between the two methods in higher values of pulse wave velocity.

This present clinical observational study does not concur with the findings of Trachet et al (12) in their validation of the Arteriograph® through a comparison with a numerical model of the arterial tree. Their principal finding was that change in transit time was observed by altering brachial compliance only, indicating that Art-PWV was only dependant on brachial stiffness and not on stiffness in the remaining part of the arterial tree. Their explanation concerning the good correlation between Art-PWV and CF-PWV in other studies was that stiffness of upper brachial segment is likely to be related to aortic stiffness. In the present study, we confirmed (23) that brachial stiffness assessed through adjusted carotid to radial PWV, adjusted carotid to brachial PWV and brachial stiffness did not change with age or

blood pressure level while CF-PWV, carotid stiffness and Art-PWV was different between normotensive young controls and older hypertensive patients. Therefore upper brachial stiffness is not related to aortic stiffness. And secondly, Art-PWV was well correlated to elastic arterial stiffness (carotid and aorta) while not to muscular arterial stiffness (brachial and brachial stiffness).

Several teams have compared Art-PWV with aortic PWV measured with aplanation tonometry or piezoelectric technique: Baulmann et al (22) found a good correlation between Arteriograph® and Complior® or SphygmoCor® ($r=0.69$, $r=0.67$, $p<0.001$ respectively), Rajzer et al (24) found a less good correlation comparing Arteriograph® with Complior® and SphygmoCor® in hypertensive patients ($r=0.36$ and $r=0.29$, $p<0.05$ respectively), Nemcsik et al (25) compared Arteriograph® to Pulse Pen® (tonometric technique) and didn't find a significant correlation. Finally, Horvath et al (26) compared Arteriograph® to invasive technique with an intra-aortic catheter and found an unexpected good correlation ($r = 0.91$ $p<0.001$). Facing this controversy, Nemcsik et al (25) explained the difference by the fact that the methods are different, Pulse pen® using a classical ECG-guided sequential tonometric measurements to obtain CF-PWV and Arteriograph® calculating PWV by estimating the time delay based on the identification of the early and late systolic peak. It is clear now that time return derived from aortic or carotid pressure used to estimate aortic PWV is often different from the so-called CF-PWV, this method is unlikely to be correct as it has been found that with aging, PWV increased but the travel time decreased only little. With aging reflection site is moving toward to the periphery according to Mitchel et al (27,28) and Westerhof et al (29) or closer to the heart according to Segers et al and O'Rourke et al. (30,31) Therefore in patients with high aortic stiffness, Arteriograph® might be less accurate to well define the early and late systolic peak, leading to inaccurate time delay estimation, but also with aging,

the reflection site is moving, leading to inaccurate distance as well, both leading to an increase of differences between Art-PWV and CF-PWV.

The second part of this study was to compare the determinants of CF-PWV and Art-PWV and to study the determinants which explained in part the discrepancies. We found that determinants of CF-PWV and Art-PWV were similar. Independent determinants of CF-PWV and Art-PWV were mostly the determinants of aortic stiffness and were pulse pressure and age (21). The distance needed for the calculation of Art-PWV and CF-PWV was also a determinant. Indeed if the operator overestimated the distance, the calculation consequently would be overestimated. It underlined the importance of the manual measurement of the distance by the operator and as well the limit of both techniques. The only difference we found between the determinants of Art-PWV and CF-PWV were the influence of gender on Art-PWV but not on CF-PWV. Women had lower Art-PWV than men.

In the analysis of the determinants of discrepancies between Art-PWV and CF-PWV we found similar results than for the analysis of the determinants of Art-PWV; age, gender and $distance_{jug-symp}$ differently affected the two parameters explaining 61% of the discrepancies. Here again $distance_{jug-symp}$ explained a large part of the discrepancies and underlined the importance in the accuracy of the calculation of Art-PWV. The distance between jugulum and pubic symphysis might be inaccurate. An adjustment similar to the distance between carotid and femoral arteries applied for the CF-PWV may have to be done for Art-PWV, it could explained then the influence of gender as a determinant of Art-PWV and discrepancies. In order to be more accurate in the analysis of the discrepancies between both parameters, we studied the determinants of CF- Δt , and Art- Δt , which were not affected by operator. We found exactly the same determinants in the same proportions knowing that distances were not taking into account. The differences were explained by age and gender.

To conclude, this present study confirmed that Arteriograph® measured elastic artery stiffness more than brachial elastic artery stiffness. In addition we found that determinants of Arteriograph® PWV were similar to the determinants of aortic stiffness. Nevertheless, Arteriograph® seemed to be less accurate in patient with increasing cardiovascular risk factors and might be overestimated. Adjustments may have to be done in future studies.

REFERENCES

- (1) Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007;25(6):1105-87.
- (2) Lim HE, Park CG, Shin SH, Ahn JC, Seo HS, Oh DJ. Aortic pulse wave velocity as an independent marker of coronary artery disease. *Blood Press* 2004;13(6):369-75.
- (3) Meaume S, Benetos A, Henry OF, Rudnichi A, Safar ME. Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects >70 years of age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):2046-50.
- (4) Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Knetsch AM, van den Meiracker AH, Schalekamp MA, Hofman A, et al. Arterial stiffness as the candidate underlying mechanism for postural blood pressure changes and orthostatic hypotension in older adults: the Rotterdam Study. *J Hypertens* 2006;24(2):339-44.
- (5) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 1999;99(18):2434-9.
- (6) Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 2002;106(16):2085-90.
- (7) Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*. 2001;37(5):1236-1241.
- (8) Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*. 2002;39(1):10-15.
- (9) Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*. 2003;34(5):1203-1206.
- (10) Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006;113(5):664-670.
- (11) Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-2605.
- (12) Trachet B, Reymond P, Kips J, Swillens A, De Buyzere M, Suys B, Stergiopoulos N, Segers P. Numerical validation of a new method to assess aortic pulse wave velocity from a single recording of a brachial artery waveform with an occluding cuff. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(3):876-888.
- (13) Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, Target R, Levy BI. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension*. 1995;26(3):485-490.
- (14) Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR, Webb DJ. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens*. 1998;16(12 Pt 2):2079-2084.
- (15) Collaboration RVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in

- the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010;31(19):2338-2350.
- (16) Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FU, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*. 2012;30(3):445-448.
- (17) Beaussier H, Masson I, Collin C, Bozec E, Laloux B, Calvet D, Zidi M, Boutouyrie P, Laurent S. Carotid plaque, arterial stiffness gradient, and remodeling in hypertension. *Hypertension*. 2008;52(4):729-736.
- (18) Meinders JM, Brands PJ, Willigers JM, Kornet L, Hoeks AP. Assessment of the spatial homogeneity of artery dimension parameters with high frame rate 2-D B-mode. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27(6):785-794.
- (19) Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Zidi M, Agabiti-Rosei E, Laurent S. Multiaxial mechanical characteristics of carotid plaque: analysis by multiarray echotracking system. *Stroke*. 2007;38(1):117-123.
- (20) Laurent S, Caviezel B, Beck L, Girerd X, Billaud E, Boutouyrie P, Hoeks A, Safar M. Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):878-883.
- (21) Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano AI, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension*. 2006;47(3):371-376.
- (22) Baulmann J, Schillings U, Rickert S, Uen S, Dusing R, Illyes M, Cziraki A, Nickering G, Mengden T. A new oscillometric method for assessment of arterial stiffness: comparison with tonometric and piezo-electronic methods. *J Hypertens*. 2008;26(3):523-528.
- (23) Nichols WW, Denardo SJ, Wilkinson IB, McEniery CM, Cockcroft J, O'Rourke MF. Effects of arterial stiffness, pulse wave velocity, and wave reflections on the central aortic pressure waveform. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008;10(4):295-303.
- (24) Rajzer MW, Wojciechowska W, Klocek M, Palka I, Brzozowska-Kiszka M, Kawecka-Jaszcz K. Comparison of aortic pulse wave velocity measured by three techniques: Complior, SphygmoCor and Arteriograph® . *J Hypertens*. 2008;26(10):2001-2007.
- (25) Nemcsik J, Egresits J, El Hadj Othmane T, Fekete BC, Fodor E, Szabo T, Jarai Z, Jekkel C, Kiss I, Tisler A. Validation of Arteriograph® - a new oscillometric device to measure arterial stiffness in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(3):223-229.
- (26) Horvath IG, Nemeth A, Lenkey Z, Alessandri N, Tufano F, Kis P, Gaszner B, Cziraki A. Invasive validation of a new oscillometric device (Arteriograph®) for measuring augmentation index, central blood pressure and aortic pulse wave velocity. *J Hypertens*. 2010;28(10):2068-2075.
- (27) Mitchell GF, Conlin PR, Dunlap ME, Lacourciere Y, Arnold JM, Ogilvie RI, Neutel J, Izzo JL, Jr., Pfeffer MA. Aortic diameter, wall stiffness, and wave reflection in systolic hypertension. *Hypertension*. 2008;51(1):105-111.
- (28) Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;43(6):1239-1245.
- (29) Westerhof BE, van den Wijngaard JP, Murgo JP, Westerhof N. Location of a reflection site is elusive: consequences for the calculation of aortic pulse wave velocity. *Hypertension*. 2008;52(3):478-483.
- (30) O'Rourke MF, Nichols WW. Changes in wave reflection with advancing age in normal

subjects. *Hypertension*. 2004;44(6):e10-11.

(31) Segers P, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Bortel LM, De Backer G, Gillebert TC, Verdonck PR. Assessment of pressure wave reflection: getting the timing right! *Physiol Meas*. 2007;28(9):1045-1056.

Table 1. Characteristics of the population

<i>Parameters</i>	Healthy controls	Hypertensive subjects	p
	n = 30	n = 60	
Age, years	32 ± 10	66 ± 11	< 0.001
Sex, male/female	15/15	33/27	NS
Height, cm	170 ± 1	170 ± 0	NS
Weight, kg	68 ± 18	72 ± 13	NS
BMI, m.kg ⁻²	24 ± 6	25 ± 4	NS
Systolic BP, mm Hg	115 ± 10	131 ± 16	< 0.001
Diastolic BP, mm Hg	66 ± 9	72 ± 8	< 0.001
Mean BP, mm Hg	81 ± 8	95 ± 12	< 0.001
Pulse pressure, mm Hg	49 ± 7	58 ± 12	< 0.001
Aortic Systolic BP, mm Hg	100 ± 12	124 ± 17	< 0.001
Hypercholesterolemia, %	0	52	-
Diabetes mellitus, %	0	8	-
Smokers, current-past, %	0	48	-
Anti-hypertensive treatment			
ACE inhibitors or ARBs, %	0	78	-
Calcium channel blockers, %	0	48	-
Diuretics, %	0	50	-
β-blockers, %	0	38	-

BMI: body mass index, BP: blood pressure, ACE inhibitors: angiotensin-converting enzyme inhibitors, ARBs: angiotensin II receptor blockers.

Table 2. Large arteries properties characteristics in healthy controls, hypertensive patients and in a subgroup of hypertensive patients.

<i>Parameters</i>	<i>Healthy controls</i> <i>N=30</i>	<i>HT patients</i> <i>N=60</i>	<i>Subgroup of HT patients N=33</i>	<i>P-value</i>
Art-PWV, m.s ⁻¹	7.1 ± 1.1	9.5 ± 1.6		< 0.001
CF-PWV, m.s ⁻¹	7.2 ± 1.3	10.2 ± 2.4		< 0.001
Carotid stiffness, m.s ⁻¹	5.2 ± 1.0	8.2 ± 2.1		<0.001
CB-PWV, m.s ⁻¹	6.6 ± 1.7	-	7.1 ± 1.3	NS
CR-PWV, m.s ⁻¹	7.8 ± 1.2	-	7.9 ± 1.0	NS
Brachial stiffness, m.s ⁻¹	9.0 ± 3.0	-	9.0 ± 2.4	NS

CF-PWV: carotid to femoral pulse wave velocity,

Art-PWV: Arteriograph® pulse wave velocity,

CR-PWV: carotid to radial pulse wave velocity,

CB-PWV: carotid to brachial pulse wave velocity,

HT: hypertensive.

Table 3. Correlations table between Arteriograph® PWV and arterial stiffness from several segments of the arterial tree.

Art-PWV	All subjects N=90	Healthy controls N=30	HT patients N=60
	R ²	R ²	R ²
CF-PWV	0.30*	0.46*	0.06
Carotid stiffness	0.46*	0.35*	0.21*
CB-PWV ⁽¹⁾	0.04	0.06	0.00
CR-PWV ⁽¹⁾	0.00	0.16*	0.08
Brachial stiffness ⁽¹⁾	0.00	0.03	0.08

Art-PWV: Arteriograph® pulse wave velocity,

CF-PWV: carotid to femoral pulse wave velocity,

CR-PWV: carotid to radial pulse wave velocity,

CB-PWV: carotid to brachial pulse wave velocity,

HT: hypertensive,

⁽¹⁾: analysis performed on healthy controls and a subgroup of 33 hypertensive patients,

*: P-value <0.05

Table 4. Bland&Altman analysis between Art-PWV and arterial stiffness from several segment of the arterial tree.

Art-PWV	All subjects N=90		Healthy controls N=30		HT patients N=60	
	R ²	Mean of differences ± SD	R ²	Mean of differences ± SD	R ²	Mean of differences ± SD
CF-PWV	0.13*	0.5 ± 2.2	0.02	0.1 ± 1.0	0.16*	0.7 ± 2.6
Carotid stiffness	0.07*	-1.6 ± 1.7	0.03	-1.9 ± 1.0	0.07*	-1.3 ± 1.9
CR-PWV ⁽¹⁾	NA	NA	0.00	0.7 ± 1.3	NA	NA
CB-PWV ⁽¹⁾	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Brachial stiffness ⁽¹⁾	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Art-PWV: Arteriograph® pulse wave velocity,

CF-PWV: carotid to femoral pulse wave velocity,

CR-PWV: carotid to radial pulse wave velocity,

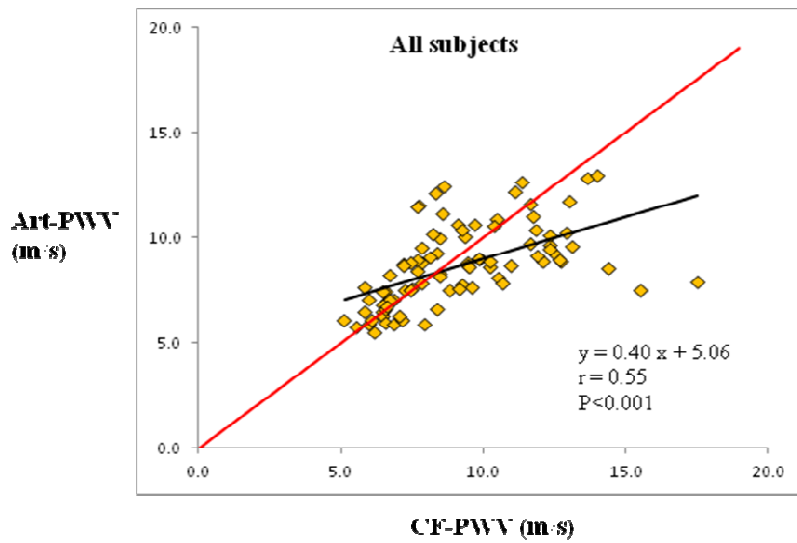
CB-PWV: carotid to brachial pulse wave velocity,

HT: hypertensive,

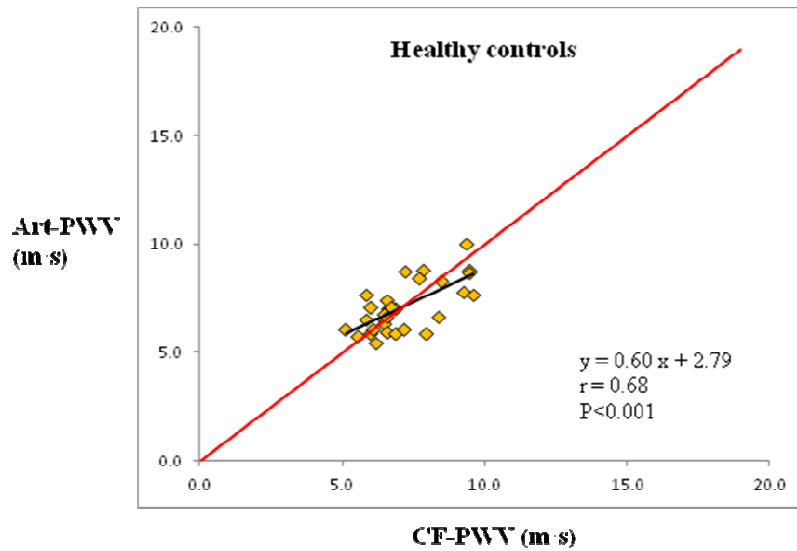
⁽¹⁾: analysis performed on healthy controls and a subgroup of 33 hypertensive patients,

*: P-value <0.05

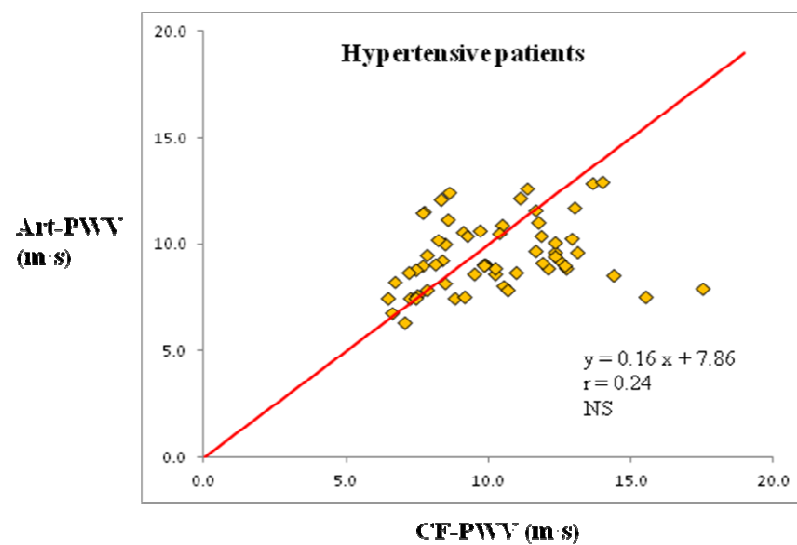
Figure 1. Correlation between CF-PWV and Arteriograph® PWV: (a) in all subjects (n=90), (b) in healthy controls (n=30), (c) in hypertensive patients (n=60).



a.



b.



c.

Figure 2. Bland & Altman representation of the comparison between CF-PWV and Art-PWV in all subjects (n=90)

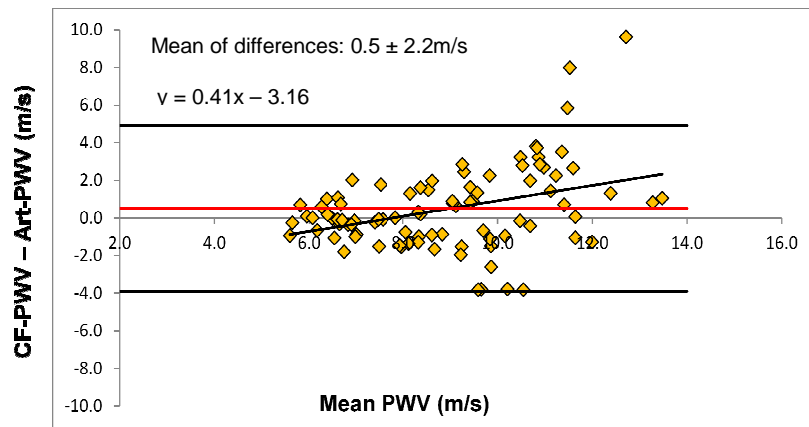
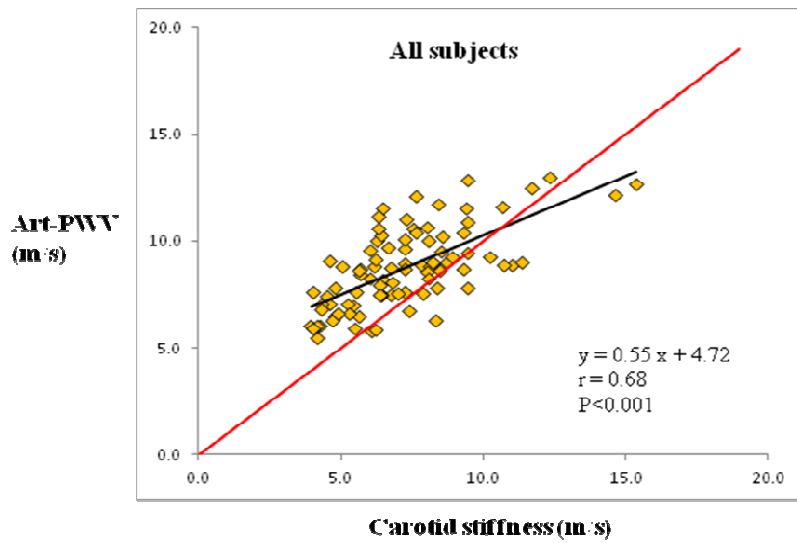
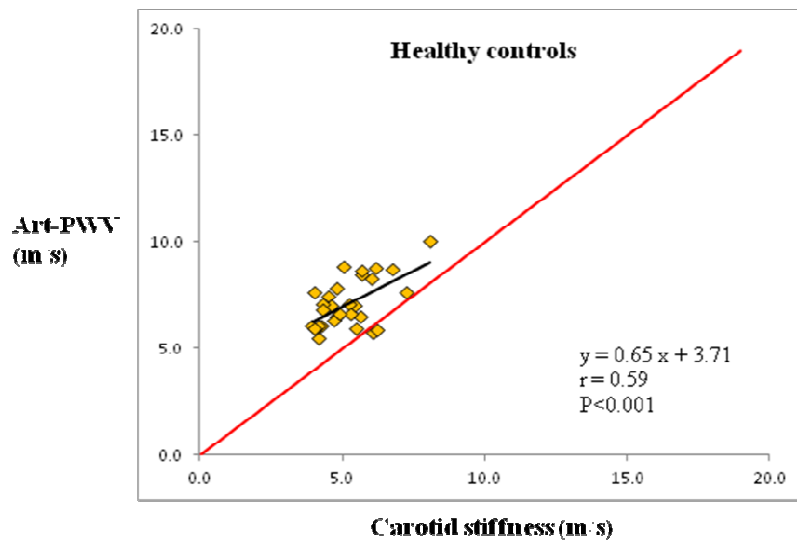


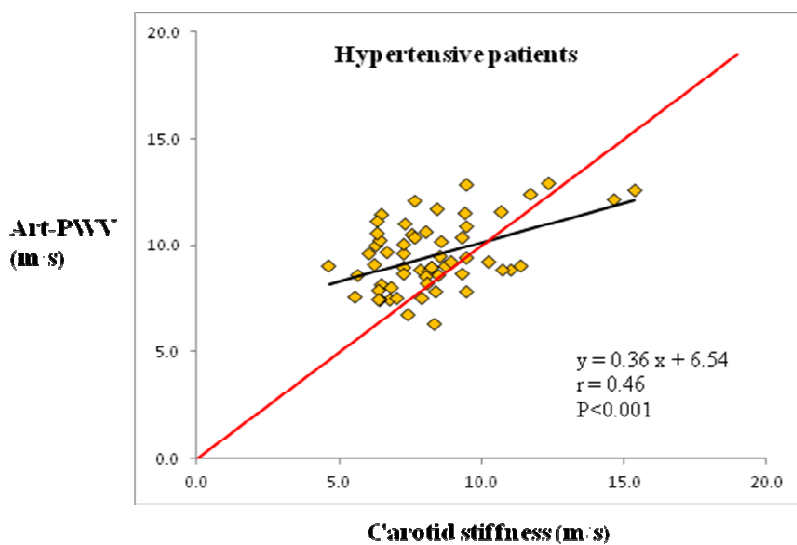
Figure 3 Correlation between Art-PWV and carotid stiffness: (a) in all subjects (n=90), (b) in healthy controls (n=30) and (c) in hypertensive patients (n=60).



a.



b.



c.

Figure 4. Bland&Altman representation of the comparison between Art-PWV and carotid stiffness in all subjects (N=90)

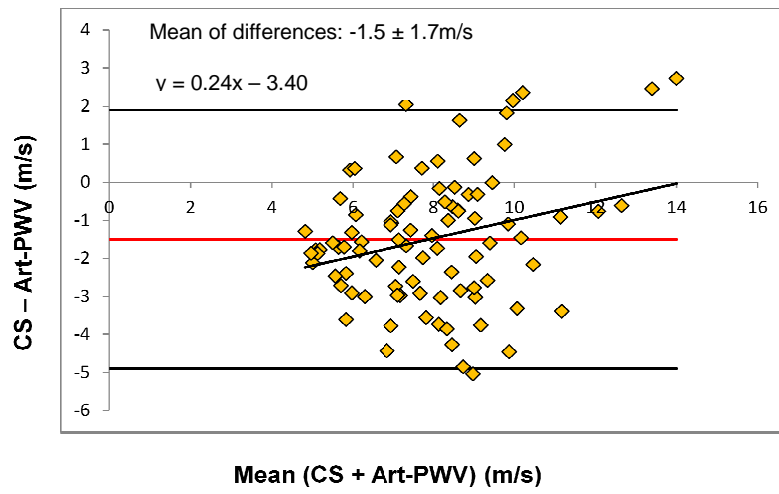


Table 5. Multivariate stepwise analysis of determinants of carotid to femoral PWV (CF- Δ PWV), Arteriograph® PWV (Art- PWV) and the determinants of the differences between both measurements (residual PWV) in all subjects (n=90).

CF-PWV			Art-PWV			Residual PWV		
Determinants	Stand Coef	R ²	Determinants	Stand Coef	R ²	Determinants	Stand Coef	R ²
Age	0.62	0.29*	Age	0.56	0.23*	Age	0.48	0.23*
Gender = F	-	0	Gender = F	-0.22	0.04*	Gender = F	-0.42	0.14*
bPP	0.32	0.08*	bPP	0.31	0.07*	bPP	-	0.01
Dist CF	0.18	0.05*	Dist jug-symp	0.30	0.07*	Dist CF	-	0
HCT status = 1	-	0	HCT status = 1	-	0	Dist Jug-symp	0.51	0.21*
Diabetes status = 1	-	0	Diabetes status = 1	-	0.01	HCT status = 1	-	0
						Diabetes status = 1	-	0.02
Explaining 42% of variance			Explaining 39% of variance			Explaining 61% of variance		

F: female

bPP : brachial pulse pressure

Dist CF : distance between carotid and femoral arteries

Dist jug-symp: distance between jugulum and pubic symphysis

HT status : hypertensive status

HCT status : hypercholesterolemia status

*: P<0.05

Table 6. Multivariate stepwise analysis of determinants of carotid to femoral time delay (CF- Δt), Arteriograph® Δt (Art- Δt) and the determinants of the differences between both measurements (residual Δt) in all subjects (n=90).

CF- Δt			Art- Δt			Residual Δt		
Determinants	Stand Coef	R ²	Determinants	Stand Coef	R ²	Determinants	Stand Coef	R ²
Age	-0.69	0.35*	Age	-0.65	0.30	Age	-0.37	0.13
Gender = F	-	0	Gender = F	0.24	0.06	Gender = F	0.34	0.12
bPP	-0.25	0.05*	bPP	-0.23	0.04	bPP	-	0
HCT status = 1	-	0	HCT status = 1	-	0	HCT status = 1	-	0
Diabetes status = 1	-	0	Diabetes status = 1	-	0	Diabetes status = 1	-	0
Explaining 40% of variance			Explaining 40% of variance			Explaining 25% of variance		

F: female

bPP : brachial pulse pressure

HT status : hypertensive status

HCT status : hypercholesterolemia status

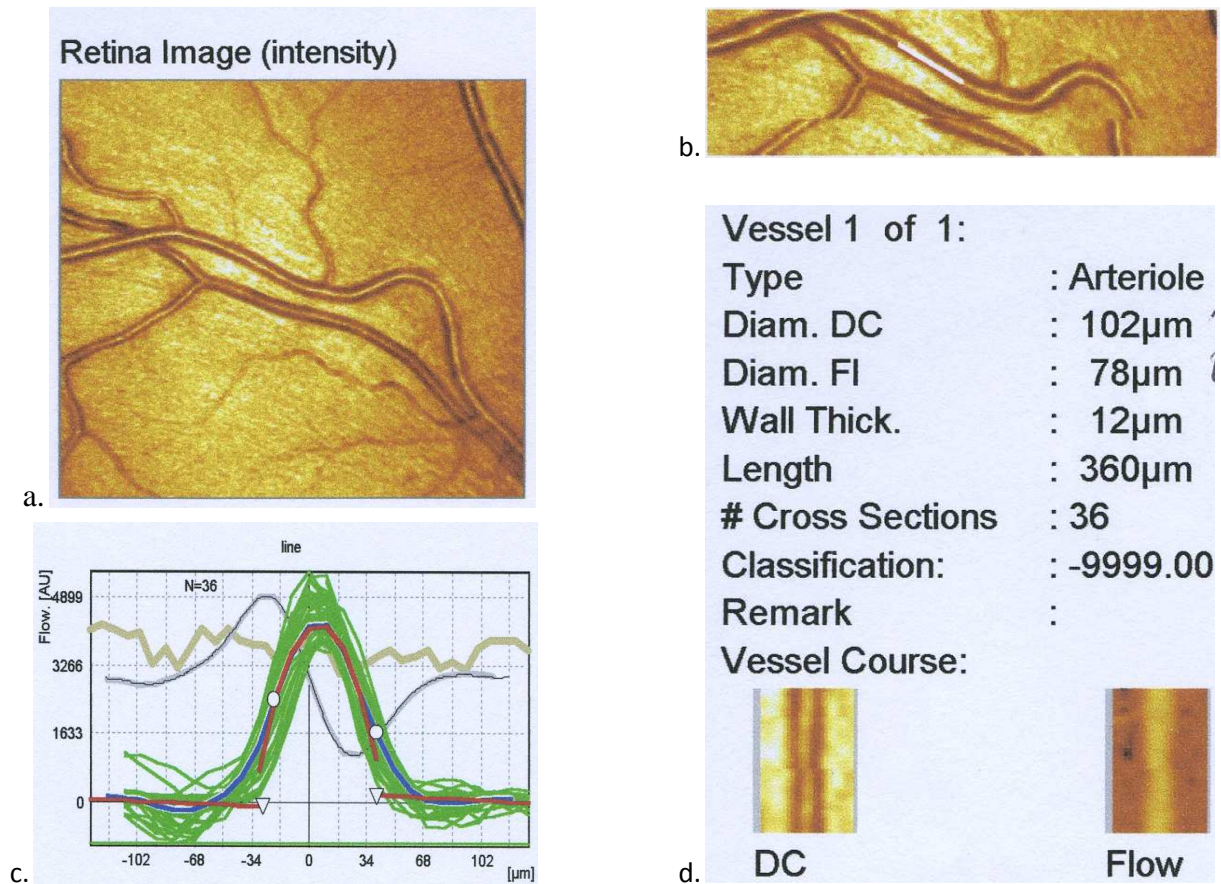
*: P<0.05

5. Scanner laser doppler des vaisseaux de la rétine (Heidelberg Retinal Flowmeter®)

HRF est un scanner laser doppler qui permet de visualiser et de mesurer les paramètres morphologiques des artéioles de la rétine utilisant le logiciel SLDF 4.0. La mesure du flux par le signal laser est couplé à une analyse d'image automatique (AFFPIA) (**Figure 28**) qui permet de mieux délimiter les vaisseaux et de mesurer directement le diamètre interne et la diamètre externe des artéioles de la rétine nécessaires au calcul de l'épaisseur de la paroi. Cette technique non-invasive est dérivée des techniques de mesure de fond d'œil pratiquées en ophtalmologie et ne nécessite pas l'utilisation de substance mydriatique. C'est une technique validée et utilisée en Allemagne et en Italie (*Harazny J Hypertens 2011 Rizzoni, J. Hypertension 2012*). Les coefficients de variation inter et intra-opérateur sont inférieurs à 5% pour le diamètre externe, à 4% pour le diamètre interne, à 10% pour l'épaisseur de la paroi, et à 10% pour le rapport diamètre externe sur diamètre interne (WLR) (**143**). La rétine est scannée dans la région temporale supérieure par rapport au nerf optique avec une lumière laser de 670nm de longueur d'onde avec une résolution de 256 points x 64 lignes x 128 lignes, pendant une période de 2 secondes.

WLR est calculée à partir de la formule suivant: $(\text{Diamètre externe} - \text{Diamètres interne}) / \text{Diamètre interne}$, et est un marqueur du remodelage des petites artères. Il a été montré que l'hypertension artérielle était associée à des modifications vasculaires de la rétine, dont un remodelage (**144**). De plus il a été montré que la pression artérielle était un déterminant majeur du WLR (**145**) et qu'un WLR élevé était associé à un haut risque d'évènement cérébrovasculaire (**146**) Ce qui fait de ce paramètre un marqueur de choix dans l'étude de l'atteinte de la microcirculation par les antiangiogéniques. Suite à des pannes répétitives en l'espace de deux ans, l'étude de l'atteinte de la microcirculation par les antiangiogéniques au moyen de cette technique n'a pu aboutir et ne sera pas développé dans cette thèse.

Figure 28. Analyse de la paroi des artérioles de la rétine avec le logiciel AFFPIA: (a) image de la région temporelle supérieure par rapport au nerf optique, (b) Segment de l'artériole sélectionné pour l'analyse (c) Analyse du flux de l'artériole, (d) Résultats de l'analyse des paramètres de la paroi de l'artériole.



Diam DC: external diameter, Diam FI: internal diameter, wall thick= wall thickness

6. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Dionex Ultimate 300®)

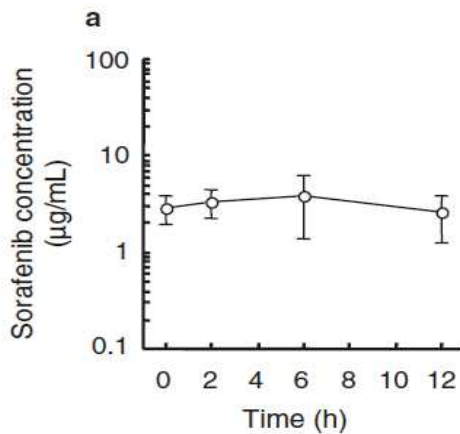
La chromatographie liquide à haute performance est une méthode de séparation et de quantification des composés d'un mélange. Le mélange est déposé à l'entrée d'une colonne, appelée phase stationnaire et va être entraîné à travers la colonne par une solution appelée phase mobile.

6.1 Prélèvements

Un prélèvement sanguin de 5 mL est collecté sur héparinate de lithium pour la mesure de la concentration plasmatique du sorafenib ou du sunitinib (+SU12662) à l'état d'équilibre. Etant donné la longue demi-vie du sorafenib et du sunitinib (**147**), la concentration plasmatique de ces médicaments varient de manière non significative au cours d'un intervalle

d'administration. (50) (**figure 29**) Par conséquent, le prélèvement sanguin a pu être réalisé à n'importe quel moment entre deux administrations du médicament. Le prélèvement est ensuite centrifugé à 3 000 tours/min pendant 5 minutes à 4°C puis le plasma est transféré dans des tubes de propylène et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse finale.

Figure 29. Evolution des concentrations plasmatiques de sorafenib sur 12 heures chez des patients traités par sorafenib (800mg/j). (50)



6.2 Dosage plasmatique du sorafenib et du sunitinib

Le dosage plasmatique de sorafenib ou du sunitinib a été réalisé au sein du laboratoire de l'Unité fonctionnelle de Pharmacochimie et de Pharmacocinétique de l'Hôpital Cochin par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse couplée à une détection dans l'ultra-violet ou dans le visible. (148,149)

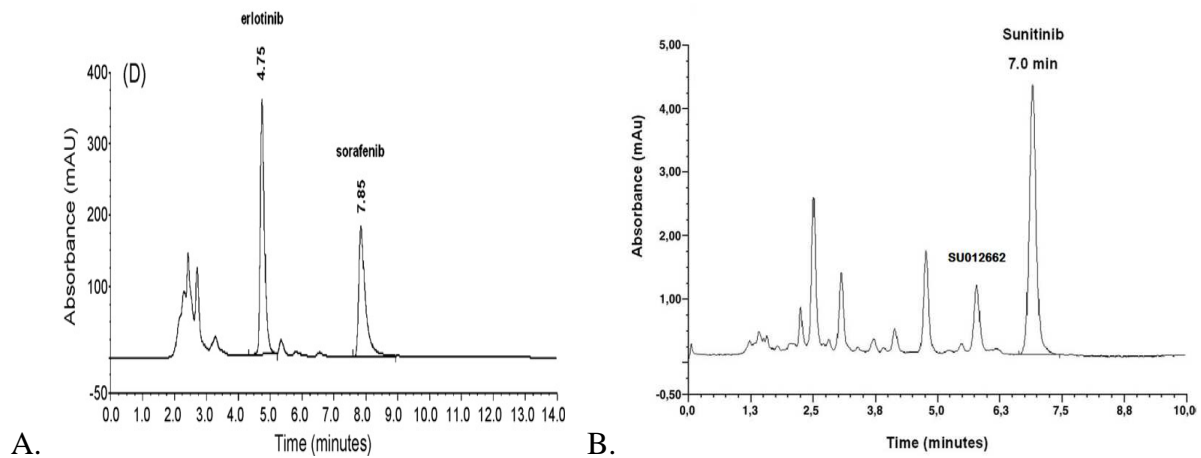
- Appareillage CLHP

Le système chromatographique Dionex Ultimate 3000® était composé d'une chambre de mélange, d'un dégazeur en ligne, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV/visible (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Le système chromatographique était piloté à l'aide du logiciel Chroméléon® (Dionex), également utilisé pour l'exploitation des données. Les colonnes utilisées pour la séparation chromatographique du sorafenib et du sunitinib étaient respectivement une colonne C18 ultrasphère ODS® (250mm×4.6mm, 5 µm ; Beckman Coulter, Fullerton, USA) et une colonne cyanopropyl Nucleodur® (150mm×4.6mm, 3 µm ; Macherey Nagel ; Hoerd, France).

- Performance des méthodes analytiques

Les deux méthodes analytiques pour la mesure des concentrations plasmatiques de sorafenib et de sunitinib (+SU12662) ont présenté une très bonne spécificité et sélectivité. La gamme d'étalonnage s'étendait de 0,5 mg/L à 20 mg/L pour le sorafenib et de 10 à 200 ng/mL pour le sunitinib et son métabolite actif SU12662. Les études de la reproductibilité et de la répétabilité pour les deux méthodes analytiques ont montré une précision satisfaisante (coefficient de variation inférieur à 10 % pour les 3 niveaux de contrôle). Les limites de quantification étaient 0,5 mg/L pour le sorafenib et 10 ng/mL pour le sunitinib et SU12662. La Figure X présente des chromatogrammes de patients traités par sorafenib (A) ou sunitinib (B).

Figure 30. Chromatogrammes de patients traités par sorafenib (A) ou sunitinib (B). Les longueurs d'onde de détection du sorafenib et du sunitinib étaient respectivement 255 et 431 nm. L'erlotinib est utilisé comme étalon interne dans la figure A, le pic précédent celui du sunitinib est celui de son métabolite SU12662 dans la figure B.



TRAVAUX DE THESE

I. ROLE DES GROSSES ARTERES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION INDUITE PAR LES ANTIANGIOGENIQUES ET LEUR ASSOCIATION AVEC LE PRONOSTIC CARCINOLOGIQUE.

Article 2: *HYPERTENSION AFTER ANITANGIOGENIC DRUGS: CHANGES IN ARTERIAL MECHANICAL PROPERTIES AND ASSOCIATION WITH CANCER PROGRESSION AND MORTALITY. Soumis à Journal of Hypertension*

La prise d'antiangiogéniques est associée à une hypertension artérielle présente chez plus de 30% des patients. Cette augmentation de pression est importante et survient dès les premiers jours de traitement. L'incidence des toxicités cardiovasculaires se trouve également augmentée chez les patients traités par AAD. Il a été montré qu'il y avait une atteinte de la microcirculation qui serait en partie responsable de l'augmentation de pression. Nous faisons l'hypothèse que la prise d'AAD induirait des modifications des propriétés élastiques des grosses artères qui joueraient un rôle dans la physiopathologie de l'hypertension induite par les AAD et que ces modifications seraient associées à la réponse à ces traitements. Dans cette optique, 57 patients ne présentant pas de contre-indications à la prise de sunitinib ou de sorafenib ont été inclus dans une étude longitudinale observationnelle. Ces patients ont été suivis toutes les deux semaines à partir de la visite d'évaluation pré-thérapeutique et ce pendant deux mois. A chaque visite, des mesures artérielles non-invasives ont été réalisées pour suivre l'évolution de la pression artérielle brachiale, centrale, de la rigidité artérielle et des paramètres de remodelage carotidien. A 6 mois de suivi, les données de progression et de mortalité ont été recueillies. Nous avons décrit pour la première fois une augmentation de la rigidité artérielle précoce après seulement 7 à 10 jours de traitements de 1m/s, parallèle à l'augmentation de pression brachiale et centrale. Nous avons également mis en évidence une augmentation du diamètre carotidien continue pendant tout le suivi. Ces modifications semblent indépendantes de l'augmentation de pression observée sous AAD. Le schéma de l'étude ne permettait pas de montrer le rôle des modifications des propriétés élastiques dans l'augmentation de pression induite par les AAD, cependant nous avons pu montrer que les propriétés mécaniques artérielles avant l'initiation du traitement prédisaient l'augmentation de pression sous AAD. En effet une atteinte préexistante de la microcirculation était associée à

une augmentation précoce de la pression systolique. En revanche, une atteinte préexistante des grosses artères était associée à une augmentation de la pression artérielle après une exposition chronique aux AAD. Contrairement à certaines données de la littérature, nous n'avons pas trouvé d'association entre l'augmentation de pression sous AAD et une efficacité de ces traitements. En revanche nous avons montré qu'une augmentation importante de la rigidité artérielle était associée à un plus haut risque de progression.

En conclusion, nous montrons qu'il se produit une atteinte des grosses artères sous AAD et que les modifications des propriétés mécaniques des grosses artères sont en partie pression indépendantes. Les propriétés des petites et grosses artères avant l'initiation du traitement prédisent l'augmentation de pression sous AAD qui ne semble pas être en lien avec la réponse à ces traitements. En revanche, une augmentation de la rigidité artérielle est associée à un plus haut risque de progression.

HYPERTENSION AFTER ANTIANGIOGENIC DRUGS: CHANGES IN ARTERIAL MECHANICAL PROPERTIES AND ASSOCIATION WITH CANCER PROGRESSION AND MORTALITY.

Maureen ALIVON*,^{1,2,3,4}

Julie GIROUX*, MD^{1,3,6}

Marie BRIET, MD^{1,2,3,5}

François GOLDWASSER, MD^{1,3,6}

Stéphane LAURENT, MD^{1,2,3,4}

Pierre BOUTOUYRIE, MD^{1,2,3,4}

(*) Both authors contributed equally.

Affiliations:

¹ Université Paris-Descartes, Paris, France;

² INSERM U970, Paris, France;

³ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris;

⁴ Department of Pharmacology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France;

⁵ Clinical Investigation Center, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France;

⁶ Department of Oncology, CERIA, Hôpital Cochin, Paris, France.

Word count: Abstract: 246 words; Word count (whole manuscript) 6625, Text proper (3519words) and 51 references + 4 tables, 2 figures and 1 supplemental table.

Short title: Arterial stiffness, wave reflection after antiangiogenic drugs

Keywords: Hypertension, blood pressure, aorta, arteries, stiffness antiangiogenic drugs,

Corresponding author and reprint address:

Prof. Pierre BOUTOUYRIE

Department of Pharmacology and INSERM U970

Hôpital Européen Georges Pompidou

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris

Université Paris Descartes

56, rue Leblanc, 75015 Paris, France

tel 00 33 1 56 09 39 91

fax 00 33 1 56 09 39 92

e-mail: pierre.boutouyrie@egp.aphp.fr

ABSTRACT

Background: Systemic hypertension is a frequent side effect of antiangiogenic drugs (AAD). We hypothesized that large arteries properties are affected by AAD, and contribute to the rise of blood pressure and that large arteries changes induced by AAD could be related to cancer progression and mortality.

Methods and results: This is a prospective, single center observational study. Participants were studied before AAD (V0), 10 days later (V1) and then every two weeks for 6 weeks (V1 to V4). We included 57 consecutive patients in whom treatment with sorafenib (400mg BID) or sunitinib (37.5mg to 50mg once daily) was indicated. The target dose could be adjusted according to tolerance and response. Aortic and carotid stiffness, brachial and central blood pressure (BP) and augmentation index were measured non-invasively at each visit. Cancer progression and mortality were collected at 6 months. Twenty height patients (49%) developed hypertension. Brachial systolic BP significantly increased during follow-up (V0-V1: $+9.6\pm 15.2$ mmHg, $P<0.001$; V0-V4: $+6.0\pm 17.8$ mmHg, $P=0.04$). Central BP, aortic and carotid stiffness increased independently of brachial BP changes. Aortic and carotid stiffening were associated with cancer progression independently of BP changes (HR= 1.24 [1.01-1.51] and 1.34 [1.03-1.73] respectively, $p<0.05$) but not with cancer mortality. Brachial systolic BP had no predictive value.

Conclusion: Large arteries stiffen during AAD treatment independently of BP changes. In this study, arterial mechanical properties are associated with BP rise and arterial stiffening is related with the effects of AAD on cancer progression independently of BP changes.

Keywords: Hypertension, blood pressure, aorta, arteries, stiffness, antiangiogenic drugs,

INTRODUCTION

Antiangiogenic drugs (AAD) form a relatively new class of anticancer therapy, with an increasing number of indications in solid tumors treatment¹. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as sunitinib (Sutent, Pfizer) and sorafenib (Nexavar, Bayer) directly inhibit the VEGF receptors and other receptors involved in angiogenesis. Sunitinib is proposed as first line treatment in metastatic renal cell carcinoma and as second line treatment in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and pancreatic neuroendocrine tumor and sorafenib, as first line treatment in hepatocellular carcinoma and as second line treatment in metastatic clear carcinoma of the kidney and metastatic thyroid cancer.^{2,3}

The most frequent side effects of AAD are cardiovascular, including thromboembolism,⁴ heart failure⁵ and systemic hypertension.⁶ Incidence of hypertension varies from 15 to 43 % of patients, according to the use of the definition of either the National Cancer Institute Investigational's Common Terminology Criteria for Adverse Event (NCI-CTCAE) or the European Society of Hypertension (ESH).⁶⁻⁸ AAD-induced hypertension is similar to essential hypertension, appears within days after introduction of AAD,^{9,10} is dose-related, can be controlled by usual anti-hypertensive treatment¹¹ and disappears after AAD discontinuation.¹² The pathophysiology of AAD-induced hypertension is not fully understood. By inhibiting the VEGF pathway, AAD can impair nitric oxide production, leading to vasoconstriction,¹³ endothelial dysfunction and capillary rarefaction.¹² There is on-going controversy as to whether capillary rarefaction is a consequence or rather a cause of BP rise¹⁴ since experimental data show that a large amount of the microcirculatory bed should be suppressed in order to increase resistance by only a small amount.¹⁵ Finally, Kappers et al showed that sunitinib-induced hypertension was associated with high levels of circulating endothelin-1 and did not involve nitric oxide or oxidative stress.^{16,17}

High PWV has been associated with further development of hypertension.¹⁸ It has been shown that surgical lesion of vasa-vasorum induced remodeling through inflammation and fibrosis.¹⁹⁻²² Suppression of VEGF-NO endothelium dependent relaxant effect might also be associated with large arteries lesions.²³ Very few data are available on the effects of AAD on large arteries in human. We hypothesized that large arteries can contribute to the rise in systolic BP after AAD. We thus studied the time-course of the non-invasively measured large arteries properties in patients after initiation of AAD, and whether large artery properties could predict the rise in brachial systolic blood pressure (bSBP), but also cancer progression and mortality.

MATERIAL & METHODS

Population and study design

In this prospective observational study, consecutive patients from the oncology department of Cochin hospital in Paris, in whom treatment with AAD (sorafenib or sunitinib) was indicated for various metastatic solid tumors, were recruited from October 2010 to October 2012. At baseline, all patients passed through standardize workup to confirm the absence of contraindication to the AAD initiation and determine the adequate initial dose. Contraindications to AAD were a performance status ≥ 3 according to the ECOG (Eastern cooperative Oncology Group),²⁴ and/or a high risk of hemorrhage or thromboembolism. Performance status is a score that quantify cancer patients' general well-being and activities of daily life, numbered from 0 (asymptomatic status) to 5 (death). Sunitinib was prescribed at 50 mg once daily for 4 weeks followed by a 2-week period untreated window or reduced dosage at 37.5mg once daily continuously, sorafenib at 400 mg BID. Blood pressure was monitored by self-measurement and during hospitalization. At V1 and after, if BP was above 140/90 mmHg, patients could receive a calcium channel blocker (amlodipine 5 mg daily or 10 mg if BP remained high), according to our practice.²⁵ Non-invasive investigation was performed at baseline (V0), after 7 to 10 days of AAD

(V1) and then every two weeks for 6 weeks (V1 to V4). After 6 months follow-up, progression and mortality data were collected, using clinical examination report and the RECIST criteria (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours²⁶) to confirm the progression. Patients provided written informed consent before baseline testing. The study protocol was performed within the Angiogenesis Inhibitors Study and Research Centre (CERIA) and was approved by the Cochin Ethics committee (approval number N° 12804766).

Blood pressure and arterial investigation

Brachial BP was measured after at least 10 minutes recumbent in supine position, using an oscillometric device (Dinamap®). Three measurements were recorded and the mean of the three measurements were calculated for SBP, diastolic BP (DBP) and mean BP (MBP). Brachial pulse pressure (bPP) was calculated as the difference between bSBP and bDBP. Central SBP, central augmentation index (AIx), and aortic stiffness were estimated by aplanation tonometry with the validated SphygmoCor® device (Atcor Medical).^{27,28} Aortic pressure waveform was determined from the radial artery waveform using a transfer function, and calibrated against an oscillometric brachial BP (Dinamap®) according to international Guidelines.²⁸ From the aortic pressure waveform, central systolic and pulse pressure (cSBP and cPP) were calculated. Central AIx was defined as the ratio of the late systolic boost in the aortic pressure wave (also named augmented pressure, AP) over PP, expressed as a percentage (AP/PP). AIx was normalized for heart rate of 75 bpm (AIx@75).

Aortic stiffness was measured using carotid-to-femoral pulse wave velocity (PWV), according to international Guidelines²⁸ and was recorded along the descending thoraco-abdominal aorta. Briefly, wave forms were obtained transcutaneously over the right common carotid artery and femoral artery, and the time delay (t) was measured between the feet of two waveforms according to ECG signals at both sites. The distance (D) covered by the waves was

established as the direct distance between the two recording sites. PWV was calculated as $PWV = D \times 0.8 / t$ (m/s), according to International guidelines.^{29,30}

Patients underwent measurements of the common carotid artery (CCA) geometry and function with an ultrasound system (Artlab®, Esaote Pie-Medical, Italy) based on high-resolution echotracking technology including the use of a 128 RF line multiarray.^{31,32} This technology gives access to all major mechanical parameters in real time. Using the bidimensional acquisition mode, intima-media thickness (IMT) and external diameter (De) were obtained with a 21 μm resolution at each of the 128 sites of a 4 cm long CCA segment and using the arterial wall motion acquisition mode, distension were calculated with a 1.7 μm spatial resolution at each of the 14 sites of a 2 cm-long CCA segment (distension = $D_s - D_d$, where D_s is systolic internal diameter and D_d , diastolic internal diameter).³¹ Carotid distensibility (Cdist) was calculated as $\Delta A / (A \cdot \Delta P)$ where A is the diastolic lumen area, ΔA is the stroke change in lumen area and ΔP is local PP, measured by aplanation tonometry. We converted this into carotid stiffness (CS) by using the Bramwell-Hill equation, $PWV = (PP \cdot A / \Delta A)^{1/2}$, which gives $CS = (Cdist)^{-1/2}$ ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$).³³

Statistical analysis

Patient characteristics at baseline are given as mean \pm SD or proportion of participant in percentage. The time-course of the arterial parameters was evaluated with a mixed model analysis with a Bonferroni correction because of the longitudinal design of the study with repeated measurements. All analysis were pre-specified. The study was powered according to the following data: mean change in SBP with AAD drugs from 11 published trials: $+15 \pm 5$ mmHg, decrease in PWV and SBP in Ong's individual data meta-analysis³⁴: -1.30 ± 1.9 m/s of -15 ± 15 mmHg, respectively, change in PWV, pressure independent: -0.55 ± 1.60 m/s in the placebo group. The aim was to demonstrate a minimum of 0.5 m/s increase after adjustment on blood pressure changes after AAG drugs. This gave $n=73$ for 0.5 m/s, $n=39$ for 0.7 m/s and $n=24$ for

0.9 m/s difference, for $\alpha=0.05$ and $\beta=0.20$. These numbers appeared reasonable for our recruitment possibilities. Determinants of early and chronic brachial SBP changes under AAD were analyzed through a robust multivariate regression. Predictive factors for cancer progression and mortality were studied with a Cox regression with the calculation of a hazard risk (HR). Statistical significance was reached for $P<0.05$.

RESULTS

Patient characteristics

Among 65 patients with a performance status between 0-2 and considered as eligible, 57 did not present contraindication to the initiation of AAD and were enrolled and treated from October 2010 to March 2013. The flow chart is presented on **Figure 1**. Although all patients underwent aplanation tonometry measurements, only 45 underwent high resolution echotracking measurements because of device availability. **Table 1** presents the characteristics of the patients at baseline. Forty-two percent of patients had treated hypertension, and blood pressure was normal in most of patients. Carotid-to-femoral PWV was in the high range ($>80^{\text{th}}$ percentile) whereas IMT was in the normal range, according to the reference value for this range of age in healthy population.^{29,35} Renal cell carcinoma was the dominant cancer ($n=27$), followed by hepatocellular carcinoma ($n=8$), sarcoma ($n=6$), thyroid carcinoma ($n=6$), melanoma ($n=4$), and other rare tumors ($n=6$). Among the 57 patients, 27 had received a previous chemotherapy discontinued at least two months before the baseline. Drug regimen was adjusted during follow-up according to tolerance and response (see details in **supplemental table 1**). Thirty three patients received sunitinib and 24 received sorafenib. Sunitinib was used once daily; it was initiated at 50mg once daily in 19 patients and reduced dosage (37.5 or 25mg) was used in 14 patients. Treatment was decreased during follow-up from 50mg to 37.5mg in 4 patients and 4 additional patients stopped sunitinib early. Sorafenib was prescribed twice daily; drug dosage

was initiated at 800mg in 18 patients, and 6 patients received reduced doses (600, 400 or 200 mg). 6 patients had escalation doses during follow-up and 4 patients stopped early sorafenib (**Supplemental table 1**).

28 (49%) patients developed hypertension, defined as an increase in bSBP and or bDBP over 140/90mmHg in comparison with BP values at baseline. A total of 17 (30%) patients were treated with amlodipine because of elevated blood pressure: 9 after V1, 6 after V2 and 2 after V3.

Time Course of blood pressure and arterial parameters during follow-up

Data are described in **Table 2**. Brachial blood pressure increased after only 7-10 of treatment and remained elevated, despite introduction of amlodipine in 18 patients. Central systolic blood pressure was increased more than peripheral blood pressure at any time of the study. After adjustment on bMBP, the increase in central SBP remained significant at all time ($+5.8\pm 1.8\text{mmHg}$ $p<0.01$). PWV remained elevated despite introduction of amlodipine, however, only changes at V1 and V2 were significant. Even after adjustment on bMBP, PWV increase remained significant ($+0.7\pm 0.3\text{m/s}$ $p=0.03$). In contrast, carotid diameter and stiffness remained significantly elevated during the whole course of the study, even after adjustment on bMBP. Aix@75, heart rate and IMT did not change significantly during the course of the study. Further adjustment on drug (sunitinib or sorafenib), drug dosage, and introduction of calcium antagonists did not change substantially the results.

Determinants of early and chronic systolic blood pressure changes

The determinants of early bSBP changes, i.e. after 7-10 days of AAD, are described in **Table 3** in the 57 patients. Aortic stiffness and augmentation index at inclusion, but not carotid stiffness, were associated with early bSBP changes. A low PWV and a high augmentation index were both associated with an increase in SBP (**Table 3, model 1 and 3**). Augmentation index

was associated with bSBP changes independently of PWV (**Table 3, model 4**). Nevertheless, PWV almost reached the significance as an independent determinant of bSBP changes as well ($P=0.62$). In the analysis of the determinants of chronic bSBP changes, i.e. after 21 days of AAD and beyond, both carotid and aortic stiffness, but not augmentation index, were associated with chronic bSBP changes. A low arterial stiffness was associated with an increase in bSBP (**Table 4**).

Predictive value of arterial stiffness for cancer progression

At six months follow-up, progression and mortality data were collected for the 53 patients who received AAD and underwent V0 and V1 arterial measurements, whatever the duration of the treatment. Progression results are represented in **table 5**. In multivariate analysis, aortic stiffening between V0 and V1 predicted a 24% increase in cancer progression (HR= 1.24 [1.01-1.51], $p<0.042$), independently of bMBP increase and the performance status, a score which quantify cancer patients' general well-being and activities of daily life (**Table, model 1**). Same thing for early carotid stiffening which independently predicted a 34% increase of progression (1.34 [1.03-1.73]. Interestingly, bMBP increase was not associated with a low risk of progression. Arterial stiffening and bMBP increase were not associated with cancer mortality (**Table 6**). When restricted to the population of patients with clear-cell renal carcinoma ($n=27$): carotid stiffening between V0 and V1 predicted a 19% increase in progression but because of a lack of power, the results did not reach the statistic significance (HR=1.19 [0.81-1.74] $P=0.08$).

DISCUSSION

The major findings of this study are that changes in large arteries occur during AAD treatments, and that these changes were independent of changes in blood pressure. Second, large arteries properties were associated with future increase in blood pressure following AAD. Last, early changes in arterial stiffness after AAD were associated with cancer outcome when changes in brachial blood pressure were not.

In this present study, we confirmed the early changes in blood pressure following AAD treatment. One first finding was that arterial stiffness was increased at inclusion in this population, compared with the reference value population.²⁹ This might illustrate the fact that most risk factors for cardiovascular diseases are common with risk factors of cancer.^{36,37} Brachial BP increased by 15 to 20 mmHg for the SBP earlier than two weeks after initiation of AAD; which can be seen from self-measurements records (data not shown). In parallel with these BP changes, both pulse wave velocity and central blood pressure increased. An important finding was that changes in aortic stiffness were independent of BP changes, and that changes in central BP were larger than, and independent of those of brachial BP. After adjustment on bMBP, changes in central SBP remained significant, with a 5 mmHg increase at V1. Those changes were of the same magnitude as the differential effect of antihypertensive drugs during pharmacological treatment of hypertension.^{38,39} Similarly, the increase in PWV and carotid stiffness remained significant after adjustment on bMBP, at least before the introduction of antihypertensive treatments. Those two findings together prove that changes in large arteries were partly pressure independent. Since the kinetic of such changes is fast, they must imply something additional to changes in arterial structure. Arterial stiffness is partly dependent on the composition of the artery in term of extracellular matrix (collagen, elastin mainly), which have a very slow turnover. The organization of extracellular matrix and its relation with the contractile component is also of importance.⁴⁰ The compounds of interest (sorafenib and sunitinib) might

also have vasoactive properties⁴¹ and interact with attachment proteins such as integrins^{42,43} which have faster kinetic of change than extracellular matrix components. Changes in the bounding of extracellular matrix with intracellular contractile proteins might change the overall properties of the artery.⁴³ The most likely mechanism implied in the stiffening of the large arteries under AAD is through the microvascular effect of AAD. Indeed, large arteries, down to 2 to 3 mm in diameter (coronary arteries) are heavily vascularized. MicroCT studies demonstrate that vasa-vasorum constitute fully developed vascular trees and irrigate the outer media of the arterial wall.⁴⁴ Lesion of these vasa vasorum by surgical means leads to acute and chronic stiffening of the arterial wall,²² and also to susceptibility to wall dissection in animal models.²¹ It is also likely that lesion of the abnormal vasa-vasorum surrounding atherosclerotic plaques might induce inflammation and destabilization of the plaque and promote acute events.⁴⁵ Arterial thrombosis frequency is increased by AAD treatments and the aforementioned mechanism can be implicated in these adverse events. The increase of arterial stiffness was large and even more surprising since it was already increased at baseline. Such increase can be translated into 10 years of normal aging in only 10 days⁴⁶. Early phase of treatment by AAD was also marked by a sustained dilatation of the carotid artery observed independently of blood pressure changes and despite the control of blood pressure by amlodipine for the 2 months follow-up. Because AAD induce hypoxia in tumoral tissue, this localized hypoxia may release vasodilatory factors in the systemic circulation, able to overrides the sympathetic vasoconstriction.⁴⁷ The increasing sympathetic activity which was supposed to occur within weeks after the beginning of the hypoxia conditions was masked by the introduction of amlodipine which also has a vasorelaxant effect on large arteries,⁴⁸ also the influence of the pressure-induced passive wall stretch on the baroreceptor activity leads to an increase of carotid arterial diameter.⁴⁹ However, the increase in diameter during follow-up is not explained by introduction of amlodipine in the mixed model (data not shown). Another explanation is that AAD drugs induce ischemia of the outer media

through lesions of the vasa-vasorum, which consequence at long term is fibrosis of the media.²⁰ Early time of medial ischemia has not been studied, but it is likely that there is an acute lesion of vascular smooth muscle cells and weakening of the arterial wall which is unable to withstand wall stress. The observed fibrosis after lesion of vasa-vasorum in experimental models occurs probably too late to compensate for the weakening of the wall, explaining the propensity of the arterial wall to dissection in experimental models.²² If this hypothesis is true, carotid dilatation could be an early sign of irreversible damages done to large arteries in patients treated with AAD, these damages could be of concern with increasing life expectancy of these patients. IMT did not change during follow-up despite the introduction of amlodipine in some patients probably because of the short follow-up. The variations of large artery properties after V1 are more difficult to interpret because of the introduction of amlodipine in several patients and because all patients were not exposed to AAD at subsequent visits, either because of side effects, renal function or drug schemes (see **Supplemental Table 1**). These changes could not be incremented in the mixed models.

One of the pre-specified questions was whether large arteries damages could precede the increase in blood pressure. Although it was impossible to precisely determine the time relation between the two phenomena, we found that several variables were associated with subsequent changes in blood pressure. A high AIX at baseline was associated with a larger early increase of bSBP. AIX is a complex parameter, mostly related to the magnitude of arterial wave reflection. Wave reflection is increased by the tapering of the aortic tree, the high pulse wave velocity (early wave reflection), the compliance mismatch, the inotropic state of the left ventricle and the peripheral resistances.^{50,51} We thus use in our analysis an augmentation index normalized to heart rate (Aix@75). The fact that baseline Aix@75 was an independent determinant of early bSBP changes suggests that functional and/or structural abnormalities of small arteries were present before the introduction of AAD, reducing the ability of adaptation at the beginning of the

treatment. We also found that arterial stiffness at baseline was associated with early increase in bSBP. However, the association is opposite to the one we expected. Indeed, high PWV was associated with a lower increase of brachial SBP. This might be a reflect of the cross-talk between large and small vessels, alterations of large vessels creating a reduction in compliance mismatch, thus inducing high pulsatility at the level of the microcirculation.⁵² Resultant lesions might interfere with the pharmacological action of AAD and result in lesser increase in blood pressure. In the analysis of the determinants of chronic bSBP changes i.e. after 21 days of treatment and beyond, only high arterial stiffness was associated with a lower increase of bSBP, suggesting that the influence of large arteries state overrides the one of small arteries in chronic bSBP changes under AAD.

The third important finding of the present study is that arterial stiffening was associated with cancer progression. An increase in both carotid and aortic stiffness during the first 10 day course of AAD was associated with a high risk of progression. An increase of 1m/s of aortic stiffness or carotid stiffness was associated with increased cancer progression about 24 and 34% respectively. Tumor blood vessels are deeply abnormal, tortuous, saccular, unorganized, and permeable with large gaps in the wall^{53,54}. A first simplistic explanation for the effect of AAD on tumors was that these drugs destroyed microvessels, preferentially on tumoral vasculature. This view has been challenged by several authors^{53,54}, who raised the hypothesis that the abnormal tumor microenvironment (characterized by hypoxia and high interstitial fluid pressure) fuels tumor progression and treatment resistance. They demonstrated that all components of blood and lymphatic vasculature were abnormal, creating a hostile tumor microenvironment, which normalization could improve outcome. Judicious use of AAD agents (originally designed to starve tumors) could transiently normalize tumor vasculature, alleviate hypoxia, increase delivery of drugs and antitumor immune cells, and finally improve the outcome. The fact that antifibrosis drugs are capable of normalizing the tumor microenvironment is compatible with our

results. Increased arterial stiffness may reflect an excessive effect of AAD by excessive pruning of vasa-vasorum leading to fibrosis of the wall, a phenomenon which may parallel similar effects on the tumor vasculature. Fibrosis may impede drug penetration and efficacy, thus explaining more cancer progression when large arteries stiffen. An important negative finding is that increase of blood pressure was not associated with progression or mortality.

The present study is the first attempt to investigate the early changes in the vasculature induced by AAD and propose early arterial stiffening as a “possible” marker of efficacy. This study has limitations. Many different solid tumors are pooled to study the effect of two different AAD. The studied solid tumors have different evolution in time and patients different life expectancies. As a sensitivity analysis, we restricted the analysis to clear-cell renal carcinoma (n=27) and found similar results. This result is only indicative since the analysis was not pre-specified. Arterial remodeling and stiffening are generally partly pressure dependent; in order to study the true effect of AAD on large arteries properties we adjusted all our models to BP. Another limit is the fact that this is an observational study which reflects real life practices, therefore adds noise to the observations. We could not directly study the small arteries and endothelial function because of the very tight schedule and also the acceptability of long investigations for these fragile patients. Last we had limited numbers of patients and events.

In conclusion, in this prospective observational study, initial large arteries mechanical properties are altered early after starting AAD treatment. Increased wave reflections and decreased arterial stiffness at baseline are associated with SBP increase under AAD. Early increase in arterial stiffness is associated with cancer progression. Further studies are needed to identify the mechanisms by which AAD affect large arteries and the relation between arterial stiffening with cancer progression and to determine whether arterial parameters are useful to monitor treatment or establish prognosis in the course of AAD or other chemotherapies.

Author contribution

Conception and design: Laurent S, Goldwasser F, Boutouyrie P, Giroux J

Provision of study materials or patients: Boutouyrie P, Giroux J, Goldwasser F and medical doctors from CERIA at Cochin hospital

Collection and assembly data: Alivon M, Giroux J

Data analysis and interpretation: Alivon M, Giroux J, Briet M, Laurent S, Boutouyrie P

Manuscript writing: Alivon M, Giroux J, Briet M, Laurent S, Boutouyrie P

Author's disclosures of potential conflicts of interest

Funding: None

REFERENCES

1. Le Tourneau C, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2008;34(1):37-48.
2. Eichholz A, Merchant S, Gaya AM. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Onco Targets Ther* 2010;3:69-82.
3. Blumenthal GM, Cortazar P, Zhang JJ, Tang S, Sridhara R, Murgo A, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist* 2012;17(8):1108-13.
4. Choueiri TK, Schutz FA, Je Y, Rosenberg JE, Bellmunt J. Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Clin Oncol* 2010;28(13):2280-5.
5. Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, Woulfe K, Pravda E, Cassiola F, Desai J, George S, Morgan JA, Harris DM, Ismail NS, Chen JH, Schoen FJ, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Force T, Chen MH. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet* 2007;370(9604):2011-9.
6. Wu S, Chen JJ, Kudelka A, Lu J, Zhu X. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2008;9(2):117-23.
7. Mir O, Coriat R, Cabanes L, Ropert S, Billefont B, Alexandre J, Durand JP, Treluyer JM, Knebelmann B, Goldwasser F. An observational study of bevacizumab-induced hypertension as a clinical biomarker of antitumor activity. *Oncologist* 2011;16(9):1325-32.
8. Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2009;48(1):9-17.
9. Azizi M, Chedid A, Oudard S. Home blood-pressure monitoring in patients receiving sunitinib. *N Engl J Med* 2008;358(1):95-7.
10. Maitland ML, Kasza KE, Karrison T, Moshier K, Sit L, Black HR, Undevia SD, Stadler WM, Elliott WJ, Ratain MJ. Ambulatory monitoring detects sorafenib-induced blood pressure elevations on the first day of treatment. *Clin Cancer Res* 2009;15(19):6250-7.
11. Halimi JM, Azizi M, Bobrie G, Bouche O, Deray G, des Guetz G, Lecomte T, Levy B, Mourad JJ, Nochy D, Oudard S, Rieu P, Sahali D. Vascular and renal effects of anti-angiogenic therapy. *Nephrol Ther* 2008;4(7):602-15.
12. Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol* 2008;19(5):927-34.
13. Robinson ES, Khankin EV, Choueiri TK, Dhawan MS, Rogers MJ, Karumanchi SA, Humphreys BD. Suppression of the nitric oxide pathway in metastatic renal cell carcinoma patients receiving vascular endothelial growth factor-signaling inhibitors. *Hypertension* 2010;56(6):1131-6.

14. Sane DC, Anton L, Brosnihan KB. Angiogenic growth factors and hypertension. *Angiogenesis* 2004;7(3):193-201.
15. Lattimer SA, Sima AA, Greene DA. In vitro correction of impaired Na⁺-K⁺-ATPase in diabetic nerve by protein kinase C agonists. *Am J Physiol* 1989;256(2 Pt 1):E264-9.
16. Kappers MH, van Esch JH, Sluiter W, Sleijfer S, Danser AH, van den Meiracker AH. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension* 2010;56(4):675-81.
17. Kappers MH, de Beer VJ, Zhou Z, Danser AH, Sleijfer S, Duncker DJ, van den Meiracker AH, Merkus D. Sunitinib-induced systemic vasoconstriction in swine is endothelin mediated and does not involve nitric oxide or oxidative stress. *Hypertension* 2012;59(1):151-7.
18. Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS, Mitchell GF. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *JAMA* 2012;308(9):875-81.
19. Stefanadis CI, Karayannacos PE, Boudoulas HK, Stratos CG, Vlachopoulos CV, Dontas IA, Toutouzas PK. Medial necrosis and acute alterations in aortic distensibility following removal of the vasa vasorum of canine ascending aorta. *Cardiovasc Res* 1993;27(6):951-6.
20. Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, Agapitos M, Toutouzas P. Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation* 1995;91(10):2669-78.
21. Angouras D, Sokolis DP, Dosios T, Kostomitsopoulos N, Boudoulas H, Skalkeas G, Karayannacos PE. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17(4):468-73.
22. Osada H, Kyogoku M, Ishidou M, Morishima M, Nakajima H. Aortic dissection in the outer third of the media: what is the role of the vasa vasorum in the triggering process? *Eur J Cardiothorac Surg* 2013;43(3):e82-8.
23. Bry M, Kivela R, Holopainen T, Anisimov A, Tammela T, Soronen J, Silvola J, Saraste A, Jeltsch M, Korpisalo P, Carmeliet P, Lemström KB, Shibuya M, Ylä-Herttuala S, Alhonen L, Mervaala E, Andersson LC, Knuuti J, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation. *Circulation* 2010;122(17):1725-33.
24. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982;5(6):649-55.
25. Mir O, Coriat R, Ropert S, Cabanes L, Blanchet B, Camps S, Billefont B, Knebelmann B, Goldwasser F. Treatment of bevacizumab-induced hypertension by amlodipine. *Invest New Drugs* 2012;30(2):702-7.
26. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R,

- Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45(2):228-47.
27. Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger JN, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Circulation* 2004;109(12):1530-5.
 28. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H; European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27(21):2588-605.
 29. Collaboration RVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J* 2010;31(19):2338-50.
 30. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FU, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T; Artery Society; European Society of Hypertension Working Group on Vascular Structure and Function; European Network for Noninvasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* 2012;30(3):445-8.
 31. Meinders JM, Hoeks AP. Simultaneous assessment of diameter and pressure waveforms in the carotid artery. *Ultrasound Med Biol* 2004;30(2):147-54.
 32. Ong KT, Perdu J, De Backer J, Bozec E, Collignon P, Emmerich J, Fauret AL, Fiessinger JN, Germain DP, Georgesco G, Hulot JS, De Paepe A, Plauchu H, Jeunemaitre X, Laurent S, Boutouyrie P. Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet* 2010;376(9751):1476-84.
 33. Painsi A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano AI, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension* 2006;47(3):371-6.
 34. Ong KT, Delorme S, Pannier B, Safar ME, Benetos A, Laurent S, Boutouyrie P. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens*. 2011;29(6):1034-1042.
 35. Engelen L, Ferreira I, Stehouwer CD, Boutouyrie P, Laurent S. Reference intervals for common carotid intima-media thickness measured with echotracking: relation with risk factors. *Eur Heart J* 2013;34(30):2368-80.
 36. Berry L. Better long-term support needed to cut cancer deaths. *Nurs Older People* 2012;24(8):7.
 37. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, Hartge P, Gapstur SM. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med* 2013;368(4):351-64.
 38. Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(8):1698-711.

39. Boutouyrie P, Achouba A, Trunet P, Laurent S. Amlodipine-valsartan combination decreases central systolic blood pressure more effectively than the amlodipine-atenolol combination: the EXPLOR study. *Hypertension* 2010;55(6):1314-22.
40. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 2005;45(6):1050-5.
41. Papadopoulou DN, Mendrinou E, Mangioris G, Donati G, Pournaras CJ. Intravitreal ranibizumab may induce retinal arteriolar vasoconstriction in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009;116(9):1755-61.
42. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z, Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(4):H2597-604.
43. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension* 2014;63(3):520-6.
44. Gossel M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(5):H2019-26.
45. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 2013;22(6):399-411.
46. Alghatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG. Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension* 2013;62(5):934-41.
47. Bartsch P, Gibbs JS. Effect of altitude on the heart and the lungs. *Circulation* 2007;116(19):2191-202.
48. Chen JL, Shang QH, Hu W, Liu C, Mao WH, Liu HQ. Role of TGF-beta1/Smads pathway in carotid artery remodeling in renovascular hypertensive rats and prevention by Enalapril and Amlodipine. *J Geriatr Cardiol* 2012;9(2):185-91.
49. Bonyhay I, Jokkel G, Karlocai K, Reneman R, Kollai M. Effect of vasoactive drugs on carotid diameter in humans. *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 2):H1629-36.
50. Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens* 2005;18(1 Pt 2):3S-10S.
51. Sharman JE, Davies JE, Jenkins C, Marwick TH. Augmentation index, left ventricular contractility, and wave reflection. *Hypertension* 2009;54(5):1099-105.
52. Laurent S, Briet M, Boutouyrie P. Large and small artery cross-talk and recent morbidity-mortality trials in hypertension. *Hypertension* 2009;54(2):388-92.

53. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol.* 2013;31(17):2205-2218.
54. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):417-427.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Characteristics of the population at baseline

	Value
Clinic	
Gender (% male/female)	63/37
Age (yrs)	59 ± 15
Height (m)	1.71 ± 0.11
Weight (kg)	75 ± 14
Body mass index (kg.m ⁻²)	25 ± 4
Heart Rate (bpm)	75 ± 14
Brachial Systolic blood pressure (mmHg)	128 ± 21
Brachial Diastolic blood pressure (mmHg)	74 ± 11
Brachial Mean blood pressure (mmHg)	95 ± 15
Brachial Pulse Pressure (mmHg)	53 ± 14
Hypertension (n, %)	24(42)
Dyslipidemia (n, %)	18(32)
Diabetes (n, %)	8(14)
Central blood pressure	
Aortic Systolic blood pressure (mmHg)	116 ± 20
Aortic Pulse Pressure (mmHg)	40 ± 13
Aortic Augmentation index (%)	24 ± 14
Alx normalized for heart rate of 75 bpm (%)	21 ± 10
Aorta	
Pulse wave velocity (m.s ⁻¹)	10.0 ± 2.3
Carotid	
Carotid Stiffness (m.s ⁻¹)	6.7 ± 1.6
Distensibility (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	26.9 ± 14.7
Compliance (m ² .kPa ⁻¹ .10 ⁻⁹)	745 ± 387
Intima Media Thickness (µm)	629 ± 138
Internal Diameter (mm)	6.03 ± 0.84
Medication	
Antihypertensive (n, %)	24(42)
Statins (n, %)	16(28)
Diabetes treatment (n, %)	8(14)

Values are given as mean ± SD or as number of participants (with corresponding percentages)

Clinical, central blood pressure, pulse wave velocity and medication, n=57; Carotid parameters, n=45

Table 2. Time course of arterial parameters during follow-up under AAD

	V0	V1	V2	V3	V4	Overall P-value
Brachial Systolic BP (mmHg)	128 ± 21	137 ± 21*	136 ± 15*	133 ± 18	134 ± 17*	<0.001
Brachial Diastolic BP (mmHg)	74 ± 11	81 ± 12*	80 ± 11*	78 ± 11*	78 ± 11*	<0.001
Brachial Mean BP (mmHg)	95 ± 15	100 ± 15*	100 ± 11*	99 ± 12	98 ± 11	0.01
Aortic Systolic BP (mmHg)	116 ± 20	128 ± 24*	124 ± 15*	122 ± 20	126 ± 21*	<0.001
Aortic Augmentation index @75(%)	21 ± 10	24 ± 10	23 ± 10	23 ± 11	23 ± 11	NS
Heart rate (bpm)	75 ± 14	73 ± 15	74 ± 13	74 ± 11	74 ± 13	NS
Pulse wave velocity (m/s)	10.0 ± 2.3	11.1 ± 3.1*	10.8 ± 2.6*	10.7 ± 2.8	10.3 ± 2.2	0.002
Carotid Stiffness (m/s)	6.7 ± 1.6	7.7 ± 2.1*	7.5 ± 1.2*	7.1 ± 1.4	7.6 ± 1.8*	<0.001
Car. distensibility (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	26.6 ± 14.7	20.7 ± 10.7*	19.6 ± 8.1*	22.6 ± 8.8	20.1 ± 9.4*	<0.001
Car. Internal Diameter (mm)	6.06 ± 0.85	6.22 ± 0.84*	6.26 ± 0.71*	6.22 ± 0.73*	6.28 ± 0.76*	<0.001
Intima Media Thickness (µm)	624 ± 138	614 ± 102	618 ± 108	634 ± 116	638 ± 125	NS

Values are represented as mean ± SD. Mixed model compared each visit to V0, (*): P<0.05, with a Bonferroni correction.

BP: blood pressure

PP: pulse pressure

Car: carotid

Augmentation index @75 : normalized for heart rate of 75 bpm

Brachial and aortic blood pressures, pulse wave velocity and heart rate, n=57

Carotid parameters, n=45

Table 3. Determinants of the early bSBP changes (Δ SBP) between V1 and V0 under AAD (n=53)

Δ SBP _{V1-V0}	Parameters	Reg Coef	CI95%	P-value
Model 1	BL PWV _{0.8}	-1.27	-2.43 ; -0.11	0.032
Model 2	BL Car Stiffness	0.44	-1.50 ; 2.38	NS
Model 3	BL AIX@75	0.37	0.04 ; 0.70	0.028
Model 4	BL PWV _{0.8}	-1.31	-2.69 ; 0.07	0.062
	BI AIX@75	0.38	0.05 ; 0.71	0.023

SBP: systolic blood pressure

BL: baseline

Car: carotid

PWV_{0.8}: pulse wave velocity to the factor 0.8

AIX@75: augmentation index normalized for heart rate of 75 bpm

Table 4. Determinants of chronic bSBP changes (Δ SBP) between V0 and after V2 (meanV2-V4 and V0) under AAD. (n=53)

Δ SBP _{mean(V2-24)-V0}	Parameters	Reg Coef	CI95%	P-value
Model 1	BL PWV _{0.8}	-2.46	-4.02 ; -0.90	0.003
Model 2	BL Car Stiffness	-3.96	-6.52 ; -1.39	0.004
Model 3	BL AIX@75	0.1145	-0.39 ; 0.62	NS

SBP: systolic blood pressure

BL: baseline

Car: carotid

PWV_{0.8}: pulse wave velocity to the factor 0.8

AIX@75: augmentation index normalized for heart rate of 75 bpm

Table 5. Predictive factors for cancer progression under AAD at 6 months follow-up. (n=53)

Progression	Parameters	Regression coefficient	95% CI	P-value
Model 1	Δ_{1-0} PWV _{0.8} (1m/s)	1.24	1.01-1.51	0.042
	Δ_{1-0} bMBP (10mmHg)	0.99	0.63 - 1.27	NS
	Performance Status	1.51	0.82 – 2.76	NS
Model 2	Δ_{1-0} Carotid stiffness (1m/s)	1.34	1.03 – 1.73	0.027
	Δ_{1-0} bMBP (10mmHg)	0.97	0.48 – 1.12	NS
	Performance status	2.23	1.15 – 4.30	0.017

Δ_{1-0} : changes between V1 and V0

BL: baseline before introduction of AAD

PWV_{0.8}: pulse wave velocity adjusted to the factor 0.8

bMBP: brachial mean blood pressure

Table 6. Predictive factors for cancer mortality under AAD at 6 months follow-up. (n=53)

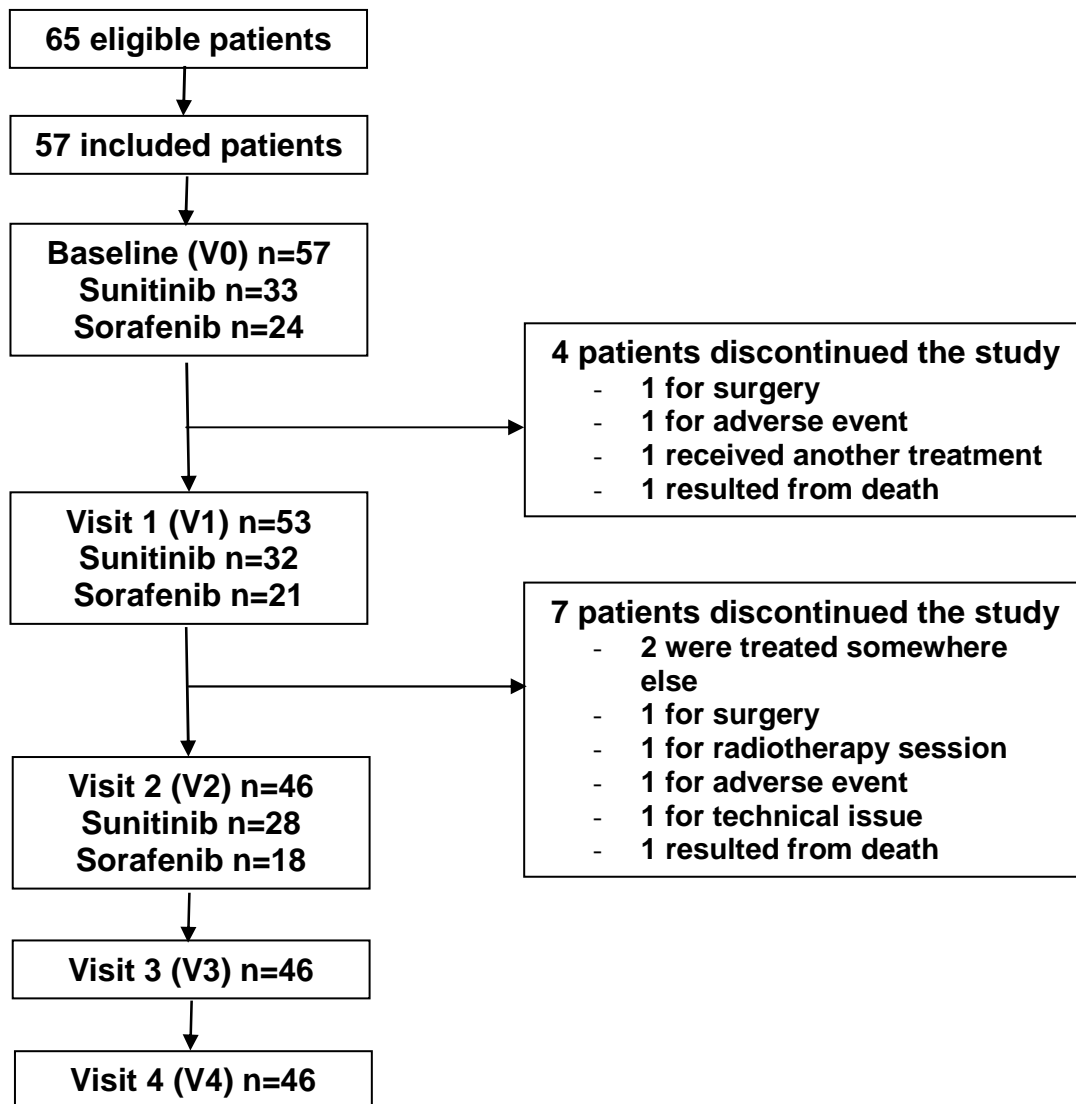
Overall survival	Parameters	Regression coefficient	95% CI	P-value
Model 1	$\Delta_{1-0}PWV_{0.8}$ (1m/s)	1.17	0.90 – 1.52	NS
	$\Delta_{1-0}bMBP$ (/10mmHg)	0.97	0.45 – 1.09	NS
	Performance Status	2.13	0.92 – 4.91	NS
Model 2	Δ_{1-0} Carotid stiffness (1m/s)	1.29	0.81 – 2.06	NS
	$\Delta_{1-0}bMBP$ (/10mmHg)	0.95	0.32 – 1.03	NS
	Performance Status	3.53	1.20 – 10.4	0.022

Δ_{1-0} : changes between V1 and V0

BL: baseline before introduction of AAD

$PWV_{0.8}$: pulse wave velocity adjusted to the factor 0.8

Figure 1. Flow chart



Supplemental Table 1. AAD doses during follow-up.

		V1		V2		V3		V4
	N	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7
Sunitinib N=33	13	50	50	50	50	0	0	50
	1	50	50	50	0	0	50	50
	2	50	50	50	0	0	37.5	37.5
	2	50	0	0	37.5	37.5	37.5	37.5
	1	50	50	0	0	0	0	0
	6	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
	4	37.5	37.5	37.5	37.5	0	0	37.5
	1	37.5	37.5	0	0	0	0	0
	1	25	25	25	25	25	25	25
	1	25	25	25	25	25	0	0
1	25	25	0	0	0	0	0	
Sorafenib N=24	12	800	800	800	800	800	800	800
	1	800	800	800	1200	1200	1200	1200
	1	800	800	800	800	800	1200	1200
	1	800	800	800	1000	1000	800	800
	1	800	800	0	0	400	400	0
	2	800	800	0	0	0	0	0
	1	600	600	600	1000	1000	1200	1200
	1	400	400	400	600	600	400	400
	1	400	400	400	400	400	400	400
	2	400	400	0	0	0	0	0
	1	200	400	400	400	400	400	400

Doses are expressed in mg daily

II. RELATION ENTRE L'ATTEINTE ARTERIELLE, L'EXPOSITION AUX ANTIANGIOGENIQUES ET LEUR EFFICACITE: UN MODELE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION.

Article 3. *RELATIONSHIP BETWEEN LARGE ARTERY PROPERTIES CHANGES, ANTIANGIOGENIC DRUGS EXPOSURE AND EFFICACY.*

En cours d'écriture.

Nous avons montré dans le premier travail qu'il y avait une atteinte artérielle sous AAD traduite par une augmentation de la rigidité artérielle et que ces modifications étaient en partie pression indépendantes. Cependant nous n'avons pas pu démontrer le rôle direct des AAD dans cette atteinte artérielle. Le dosage des concentrations plasmatiques des AAD, au cours d'un suivi thérapeutique pharmacologique, est de plus en plus répandu. Il a été montré que les concentrations plasmatiques étaient très hétérogènes entre les patients mais également associées au développement de toxicités sous AAD. Cependant il n'existe pas de seuils de concentration plasmatique permettant de juger de la qualité de l'exposition aux AAD. Dans ce deuxième travail nous faisons l'hypothèse que les concentrations plasmatiques des AAD expliquent une plus grande partie des modifications de rigidité artérielle que les modifications de pression induites par ces traitements et que l'exposition aux AAD est associée à la réponse carcinologique. A partir de la même étude longitudinale observationnelle décrite dans le premier travail, 61 patients ne présentant pas de contre-indications à la prise de sunitinib ou de sorafenib ont été inclus. En addition des mesures artérielles non-invasives réalisées à chaque visite, les dosages plasmatiques de sorafenib et de sunitinib sont réalisés à partir de la visite V1 puis toutes les deux semaines pendant la durée du suivi (V2 à V4). A 6 mois de suivi, les données de survie sont collectées. Nous montrons pour la première fois que l'atteinte artérielle observée sous AAD est partie due en à un effet pharmacologique des AAD sur les grosses artères indépendamment de l'augmentation de pression. En effet, plus la concentration plasmatique des AAD est élevée et plus l'atteinte artérielle est importante. Nous confirmons également la relation entre l'exposition aux AAD et la réponse carcinologique de ces traitements. En effet une concentration plasmatique élevée est associée à un moindre risque de progression et un moindre risque de mortalité à 6 mois. Nous proposons un seuil de concentration plasmatique du sunitinib et du sorafenib permettant de discriminer les patients sous-exposés des autres définie à 3.7mg/l pour le sorafenib et 51.7µg/l pour le sunitinib. Nous avons montré que les patients qui avaient une concentration plasmatique supérieure ou égale à

ce seuil avaient un risque de progression et de mortalité réduits de 59% et 78% respectivement (HR=0.41 [0.19-0.87], p=0.007 and HR=0.22 [0.08-0.59], p<0.001 respectivement).

En conclusion, l'atteinte artérielle observée sous AAD est due à un effet pharmacologique des AAD sur les grosses artères indépendamment de l'augmentation de pression induite par ces traitements. Les concentrations plasmatiques des AAD sont négativement associées à la réponse carcinologique et un seuil de concentration plasmatique à 3.7mg/l pour le sorafenib et 51.7µg/l pour le sunitinib permettent de discriminer les patients insuffisamment exposés qui sont plus à risque de progresser, des autres.

RELATIONSHIP BETWEEN LARGE ARTERIES PROPERTIES CHANGES, ANTIANGIOGENIC DRUGS EXPOSURE AND EFFICACY.

M. Alivon^{1,2,3,4}

B. Blanchet^{1,3,5}

J. Giroux^{1,3,6}

M. Vidal^{1,3,5,7}

F. Goldwasser^{1,3,6}

S. Laurent^{1,2,3,4}

P. Boutouyrie^{1,2,3,4}

Affiliations:

¹ Université Paris-Descartes, Paris, France;

² INSERM U970, Paris, France;

³ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris;

⁴ Department of Pharmacology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France;

⁵ Department of Pharmacology, Hôpital Cochin, Paris, France;

⁶ Department of Oncology, CERIA, Hôpital Cochin, Paris, France;

⁷ UMR 8638 CNRS, Paris, France.

Word count: Abstract: words: 316; Word count: whole manuscript (7864 words), text proper (4824 words) and 40 references + 7 tables, 3 figures and 1 supplemental table.

Short title: Arterial stiffness and pharmacokinetics of antiangiogenic drugs

Keywords: blood pressure, aortic stiffness, antiangiogenic drugs plasm concentration

Corresponding author and reprint address:

Prof. Pierre BOUTOUYRIE

Department of Pharmacology and INSERM U970

Hôpital Européen Georges Pompidou

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris

Université Paris Descartes

56, rue Leblanc, 75015 Paris, France

tel 00 33 1 56 09 39 91

fax 00 33 1 56 09 39 92

e-mail: pierre.boutouyrie@egp.aphp.fr

ABSTRACT

Objective

Antiangiogenic drugs (AAD) which are targeting the VEGF pathway are used for metastatic cancer treatment. AAD induced hypertension is frequent and not fully understood. We previously reported a pressure independent large arteries stiffening under AAD. We hypothesized that stiffening of large arteries could be related to the intensity of exposure to AAD, as measured from serial dosages in blood. We further hypothesized that exposure to AAD was related to cancer progression and mortality.

Design and method

In this prospective, single center observational study, 61 patients with metastatic cancer eligible to be treated by sorafenib or sunitinib were included. Patients were explored before the introduction of the treatment, then every two week for two months (V0 to V4). Peripheral and central blood pressure, wave reflection and aortic stiffness by pulse wave velocity (PWV) were measured. Blood samples were obtained from V1 to V4 for therapeutic drug monitoring study. Concentrations were determined by HPLC. Robust stepwise regression analysis was performed for studying the determinants of PWV increase. Cox regression and Kaplan-Meier were used to establish the relationship between AAD concentrations and cancer progression and mortality.

Results and conclusion

Mean age was 59(14), mean SBP 127(20) mmHg. At V2, mean blood pressure increased significantly by 5(14) mmHg at V2 and by 3(14) at V4. Determinants of PWV increase were high AAD plasma concentration and mean blood pressure increase (beta coefficient for 1 SD +0.37 m/s and +0.35m/s respectively, $p<0.01$). High concentration of AAD during follow-up was associated with a lesser cancer progression (HR: 0.60, 95%CI [0.38-0.97], $p=0.035$) and a lesser mortality (HR: 0.38, 95%CI [0.19-0.79], $p=0.01$). Concentrations above -0.5 SD discriminates patients with lower progression or mortality from the others, HR: 0.41 [0.19-0.87] and 0.22 [0.08-0.59] respectively.

In conclusion, large arteries stiffening observed under AAD is proportional to the intensity of exposure to AAD, independently of blood pressure increase. Patients under exposed to AAD are at higher risk of disease progression and mortality.

INTRODUCTION

Antiangiogenic drugs (AAD) are a relatively new class of anticancer therapies indicated in an increasing numbers of cancers¹. AAD have been shown to play important roles in tumor growth and angiogenesis by inhibiting the VEGF pathway.

Sorafenib (Nexavar) and sunitinib (Sutent) are multikinase inhibitors of the VEGF receptors and platelet-derived growth factors receptors (PDGFRs), stem-cell factor receptor (KIT), FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3), colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R), and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor (RET). In addition, Sorafenib inhibits the RAF/MEK/ERK signal transduction pathway^{2,3}.

Sunitinib is proposed as first line treatment in metastatic renal cell carcinoma and as second line treatment in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and pancreatic neuroendocrine tumor and sorafenib, as first line treatment in hepatocellular carcinoma and as second line treatment in metastatic clear carcinoma of the kidney and metastatic thyroid cancer^{4,5}.

The most frequent side effect is hypertension, observed in 30% of patients⁶⁻⁸. AAD-induced hypertension shares similar patterns with essential hypertension. Hypertension induces large arteries stiffening both by passive distension of arteries⁹ and by chronic remodeling of the arterial wall¹⁰⁻¹². By inhibiting the VEGF pathway and thus the tumor angiogenesis, AAD could lead to early changes in large arteries elastic properties, which could play a role in AAD-induced hypertension. We recently published that AAD induced a blood pressure independent increase in arterial stiffness, positively associated with cancer progression¹³, however, we could not demonstrate the direct implication of AAD in BP independent increase in arterial stiffness. We hypothesized that AAD plasma concentrations could be more closely related to changes in arterial stiffness than changes in blood pressure.

Both sorafenib and sunitinib share a long half-life >24h, heavy metabolism mainly through the CYP3A4, presence of active metabolites and elimination in feces^{3,14,15}. Dosage of AAD is possible and has shown important heterogeneity of plasma concentrations associated with manifestations of toxicity^{16,17}. Despite the fact that AAD therapeutic drug monitoring (TDM) is often performed, no clear target dosage emerged especially in term of efficacy. For the moment, TDM only confirms clinically observed AAD toxicity. We hypothesized that AAD plasma concentrations could be associated with tumor response.

In this present study we aimed to investigate: (1) the relationship between the exposure to AAD, blood pressure and large arteries elastic properties changes, (2) the relationship between AAD-exposure and AAD efficacy end-points and (3) to establish a cut-off of AAD plasma concentration in order to evaluate the quality of the exposure.

MATERIAL & METHODS

Population and study design

In this prospective observational study, consecutive patients from the oncology department of Cochin hospital in Paris, in whom treatment with AAD (sorafenib or sunitinib) was indicated for various metastatic solid tumors, were recruited from October 2010 to December 2013. At baseline, all patients passed through a standardized workup to confirm the absence of contraindication to the AAD initiation and determine the adequate initial dose. Contraindications to AAD were a performance status ≥ 3 according to the ECOG (Eastern cooperative Oncology Group)¹⁸, and/or a high risk of hemorrhage or thromboembolism. Sunitinib was prescribed at 50 mg once daily for 4 weeks followed by a 2-week period untreated window or reduced dosage at 37.5mg once daily continuously, sorafenib at 400 mg BID. Blood pressure was monitored by self-measurement and during hospitalization. At V1 and after, if BP was above 140/90 mmHg, patients could receive a calcium channel blocker (amlodipine 5 mg daily or 10 mg if BP remained high), according to our practice¹⁹. Non-invasive investigation was performed at baseline (V0), after 7 to 10 days of AAD (V1) and then every two weeks for 6 weeks (V2 to V4). AAD dosages were performed after the initiation of the treatment at V1 and then every two weeks (V2 to V4). After 6 months follow-up, progression and mortality data were collected, using clinical examination report and the RECIST criteria (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor)²⁰ to confirm the progression. Patients provided written informed consent before baseline testing. The study protocol was performed within the Angiogenesis Inhibitors Study and Research Centre (CERIA) and was approved by the Cochin Ethics committee (approval number N° 12804766).

Blood pressure and arterial investigation

Brachial BP was measured after at least 10 minutes recumbent in supine position, using an oscillometric device (Dinamap®). Three measurements were recorded and the mean of the three measurements were calculated for bSBP, diastolic BP (bDBP) and mean BP (bMBP). Brachial pulse pressure (bPP) was calculated as the difference between bSBP and bDBP. Central SBP, central augmentation index (AIx), and aortic stiffness were estimated by aplanation tonometry with the validated SphygmoCor® device (Atcor Medical)^{21,22}. Aortic pressure waveform was determined from the radial artery waveform using a transfer function, and calibrated against an oscillometric brachial BP (Dinamap®) according to international Guidelines²¹. From the aortic pressure waveform, central systolic and pulse pressure (cSBP and cPP) were calculated. Central AIx was defined as the ratio of the late systolic boost in the aortic pressure wave (also named augmented pressure, AP) over PP, expressed as a percentage (AP/PP).

Aortic stiffness was measured using carotid-to-femoral pulse wave velocity (PWV), according to international Guidelines²¹ and was recorded along the descending thoraco-abdominal aorta. Briefly, wave forms were obtained transcutaneously over the right common carotid artery and the femoral artery, and the time delay (t) was measured between the feet of two waveforms according to ECG signals at both sites. The distance (D) covered by the waves was established as the direct distance between the two recording sites. PWV was calculated as $PWV = D \times 0.8 / t$ (m/s), according to International guidelines^{23,24}.

Sorafenib and sunitinib therapeutic drug monitoring

At each follow-up visit, blood samples were collected into 5-mL lithium heparinized Vacutainer® tubes to determine plasma concentrations of either sorafenib or sunitinib. Given their long half-life²⁵, these two drugs exhibit constant drug level over a dosing interval. Therefore, a single blood sample was collected at any time in the dosing interval of each drug.

The plasma was separated by centrifugation (3,000 rpm, 5 minutes), and stored at -20°C until the analysis.

Plasma sorafenib concentration was measured using liquid chromatography²⁶. The intra- and inter-assay coefficients of analytical variability were both less than 10%. The lower quantification limit was 0.5 mg/l.

Sunitinib and SU12662 plasma concentrations were determined using liquid chromatography²⁷. The intra- and inter-assay coefficients of analytical variability were both less than 7%. The lower quantification limits for sunitinib and SU12662 were both 10 µg/l. Because SU12662 has an inhibitory profile similar to that of sunitinib *in vitro* and binds to similar plasma proteins, the combination of sunitinib plus SU12662 represents the total active drug measured in the plasma. In this context, the composite concentration was defined as the sum of sunitinib and SU12662 concentrations.

Statistical analysis

Patient characteristics at baseline are given as mean \pm SD or proportion of participant in percentage. T-Test comparison of baseline characteristics between patients treated with sunitinib and patients treated with sorafenib was performed. The time-course of the arterial parameters was evaluated with a mixed model analysis with a Bonferroni correction because of the longitudinal design of the study with repeated measurements. The study was powered according to the following data: mean change in bSBP with AAD drugs from 11 published trials: $+15 \pm 5$ mmHg, decrease in CF-PWV and bSBP in Ong's individual data meta-analysis²⁸: -1.30 ± 1.9 m/s of -15 ± 15 mmHg, respectively, change in CF-PWV, pressure independent: -0.55 ± 1.60 m/s in the placebo group. The aim was to demonstrate a minimum of 0.5 m/s increase after adjustment on blood pressure changes after AAD. This gave n=73 for 0.5 m/s, n=39 for 0.7 m/s and n=24 for 0.9 m/s difference, for $\alpha=0.05$ and $\beta=0.20$. Plasma concentrations of sorafenib were not

normally distributed and were log transformed. In order to combine concentrations of sorafenib and sunitinib, we used Z-score (mean=0, SD=1) in further statistics. Determinants of CF-PWV changes under AAD were analyzed through a robust stepwise regression. Predictive factors for cancer progression and mortality were studied with Cox regression models and Kaplan Meier representations with the calculation of a hazard risk (HR). All analyses were pre-specified and statistical significance was reached for $P < 0.05$.

RESULTS

Patient characteristics

Among 69 patients with a performance status between 0-2 and considered as eligible, 61 did not present contraindication to the initiation of AAD and were enrolled and treated from October 2010 to December 2013. The flow chart is presented on **Figure 1**, Among patients who started the study, 49 ended the follow-up. **Table 1** presents the characteristics of the patients at baseline treated with sunitinib (n=38) and treated with sorafenib (n=23). There were more men than women in the group treated with sorafenib, otherwise there were no statically differences for demographic parameters, either brachial or central blood pressures, central arterial parameters and cardiovascular risk factors. In the total population, 39% of patients had treated hypertension, and blood pressure was globally normal, either in treated and untreated patients. Carotid-to-femoral PWV was in the high range ($>80^{\text{th}}$ percentile) according to the reference value for this range of age in healthy population²³. Renal cell carcinoma was the dominant cancer (n=31), followed by hepatocellular carcinoma (n=8), sarcoma (n=6), thyroid carcinoma (n=6), melanoma (n=4), and other rare tumors (n=6). Among the 61 patients, 27 had received a previous chemotherapy discontinued at least two months before the baseline. Among patients treated with sunitinib (N38, 27 patients had renal cell carcinoma, 3 had sarcoma, two had prncreatic carcinoma, and 6 had various tumors. Among patients treated with sorafenib (N=23),

7 had hepatocellular carcinoma, 5 had thyroid carcinoma, 4 had melanoma, 4 had renal cell carcinoma and 3 had sarcoma.

AAD therapeutic drug monitoring

Drug regimen was adjusted during follow-up according to tolerance and response (see details in **supplemental table 1**). Thirty-eight patients received sunitinib and 23 received sorafenib. Sunitinib was used once daily; it was initiated at 50mg in 21 patients and reduced dosage (37.5 or 25mg) was used in 17 patients. Twenty-one patients completed the follow-up with unchanged treatment. Dosage was decreased during follow-up in 3 patients, increased from 25 to 37.5mg in one patient and 13 additional patients stopped sunitinib early. Sorafenib was prescribed twice daily; drug dosage was initiated at 800mg in 15 patients, and 8 patients received reduced doses (600, 400 or 200 mg). Seven patients completed the follow-up with unchanged doses, 5 patients had escalation doses during follow-up, 2 patients had decreasing doses from 800 to 400mg daily and 9 patients stopped early sorafenib (**Supplemental table 1**). Mean follow-up times were 53.9 ± 20.9 days for patients treated with sunitinib and 46.7 ± 24.7 days for patients treated with sorafenib and mean time treatment was 37.8 ± 10.0 days for patients treated with sunitinib and 36.8 ± 13.8 days for patients treated with sorafenib.

Because sunitinib and sorafenib plasma concentrations did not already reached the steady state at V1 and most of patients treated with sunitinib were not treated at V3 (two weeks off-treatment period), both visits V1 and V3 were not taken into account. Plasma concentration of sorafenib or sunitinib did not change between V2 and V4, whether before and after taking into account sunitinib active metabolite SU12662 plasma concentrations (**Table 3**).

Time course of blood pressure and arterial stiffness during follow-up

27 (44%) patients developed hypertension, defined as an increase in bSBP and or bDBP over 140/90mmHg in comparison with BP values at baseline. A total of 18 (30%) patients were treated with amlodipine because of elevated blood pressure: 8 after V1, 9 after V2 and 1 after V3.

Data are described in **Table 2**. Brachial blood pressure increased after only 7-10 of treatment and remained elevated despite the introduction of amlodipine in 18 patients (V0-V1 : $+9.1\pm 14.1$ mmHg and V0-V4: $+5.9\pm 17.2$ mmHg, $P<0.001$). Central systolic blood pressure was increased more than peripheral blood pressure at any time of the study (V0-V1: $+11.3\pm 17.4$ mmHg and V0-V4: $+7.1\pm 17.6$ mmHg, $P<0.001$). After adjustment on bMBP, the increase in central SBP remained significant at all time ($+5.7\pm 1.8$ mmHg, $P<0.01$). Carotid-to-femoral PWV also increased after 7-10 days of treatment and remained elevated despite introduction of amlodipine, however, only changes at V1 and V2 were significant. Even after adjustment on bMBP, PWV increase remained significant ($+0.7\pm 0.3$ m/s $p=0.03$). Further adjustment on drug (sunitinib or sorafenib) and introduction of calcium antagonists did not change substantially the results. Augmentation index did not change significantly during the course of the study.

Determinants of large artery stiffness changes under AAD

The analyses were only performed at V2 and V4 because sunitinib and sorafenib plasma concentrations did not already reached the steady state at V1 and most of patients treated with sunitinib were in a two weeks off-treatment period.

The determinants of CF-PWV changes at V2 i.e. after 21 ± 6 days of AAD treatment were mean blood pressure changes and plasma concentration of sorafenib or sunitinib, explaining respectively 11 and 13% of the variance (**Table 4**). An increase of 2.5mg/l (1SD) of sorafenib or 25.8 μ g/l (1SD) of sunitinib at V2 was associated with an increase of CF-PWV of 0.37m/s

$P < 0.01$. In parallel, an increase of 14mmHg (1SD) of bMBP was associated with an increase of CF-PWV of 0.35m/s. Similar results was found at V4 i.e. after 37 ± 14 days of treatment, bMBP and plasma concentration of sorafenib or sunitinib were independent determinant of CF-PWV changes, explaining 19 and 15% of the variance respectively ($P = 0.01$) (**Table 4**). An increase of 3.0mg/l (1SD) of sorafenib or 29.4 μ g/l (1SD) of sunitinib was associated with an increase of CF-PWV of 0.38m/s. In parallel, an increase of 14mmHg (1SD) of bMBP was associated with an increase of CF-PWV of 0.43m/s

There was no difference between sorafenib and sunitinib effect on arterial stiffening. However there was a difference between sunitinib and its metabolite SU12662. Sunitinib seemed to be more closely associated with CF-PWV increase than SU12662. An increase of 25.8 μ g/l (1SD) of plasma concentration of sunitinib was associated with an increase of CF-PWV of 0.33m/s ($P = 0.04$), which is similar to the result presented in Table 4. Inclusion of SU12662 in addition to sunitinib concentrations did not improve the association with PWV changes. We finally checked that there was no cumulative effect of longtime exposure to sunitinib or sorafenib on arterial stiffening. Augmentation index was not affected by plasma concentration of sunitinib or sorafenib, either by the effect of sunitinib metabolite SU12662, and either by the longtime exposure to AAD.

As a sensitivity analysis, we restricted to clear cell carcinoma patients ($N = 22$), all treated with sunitinib. We found again the association between sunitinib concentrations at V2 and PWV changes between V0 and V2, an increase of plasma concentration of sunitinib about 21.1 μ g/l (1SD) being associated with a 0.31m/s, with no additional association with SU12662 effect.

Efficacy end-points

Using a Cox regression model, we found that means of plasma concentration of sunitinib and sorafenib during follow-up were negatively associated with cancer progression and mortality. Indeed, an increase of 21.6 µg/l (1SD) of sunitinib or 2.5 mg/l of sorafenib was associated with a decrease of progression risk about 40% (HR=0.60, [0.38-0.97], P=0.035 (**Table 7**)). The result was even stronger for overall survival. An increase of 21.6µg/l (1SD) of sunitinib or 2.5mg/l of sorafenib was associated with a lower risk of mortality about 62% (HR=0.38 [0.19-0.79], P=0.01) (**Table 7**).

Plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 was not associated with cancer progression. Indeed, plasma concentration of SU12662 was not associated with cancer progression. On the contrary, plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 was related to cancer mortality. An increase of plasma concentration of 34.8 µg/l of the total drug was associated with a reduction of the risk of mortality about 50% at 6 months follow-up (HR= 0.50 [0.27-0.93], P=0.028), but plasma concentration of SU12662 here again was not associated with cancer mortality.

The analyses were performed on a subgroup of patients treated with sunitinib in renal cell carcinoma. We showed that both plasma concentration of sunitinib and its metabolite SU12662 seemed to be associated with a reduction of the risk of cancer mortality, but the results did not reached the statistical significance (P=0.062 and 0.061 respectively). On the other hand, plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 was negatively related with cancer mortality. An increase of 34.8 µg/l of sunitinib+SU12662 was associated with a reduction of the risk of mortality about 79% (RR=0.21 [0.06-0.77], P=0.019). Neither plasma concentration of sunitinib nor its metabolite were associated with cancer progression, but

plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 was near to the statistical significance (P=0.09)

Relationship between arterial stiffening, AAD exposure and progression free survival

In a cross tabulation with analyzed the distribution of progression events according to PWV changes between V0 and V1 and AAD plasma concentrations. Data are presented in table 7. Patients who were under-exposed with an important increase of PWV (group 3) counted the higher percentage of progression events (73%). At the opposite, patients who had AAD plasma concentration over the mean and a lesser increase of PWV (group2) counted the lower percentage of progression events (30%). We then pooled group 1 and 4 which were less informative and in Kaplan-Meier curves (**figure 3**) we compared the group 2, 3 and 1+4 for progression free survival. Patients from group 2 who had plasma concentration over the mean and a lesser increase of PWV were associated with a 74% reduction of the risk of progression (HR=0.23 [0.09-0.73], p=0.04) in comparison with patients from group 3 who had plasma concentration under the mean and an important increase of PWV.

Determination of plasma concentration thresholds for sorafenib and sunitinib.

Based on a ROC curve analysis, we proposed a concentration cut-off to discriminate patients under-exposed from the others. Cut-off at -0.5 SD of mean plasma concentration of sorafenib or sunitinib had a 92% sensibility and 31% specificity for cancer progression and 90% sensibility and 60% specificity for overall survival to discriminate patients. Figure 2a and 2b present the Kaplan-Meier curves for progression free survival and overall survival. Patients with a plasma concentration higher or equal to 3.7 µg/l of sorafenib or 51.7 µg/l of sunitinib was associated with a reduction of the risk of progression about 59% (HR=0.41 [0.19-0.87], p=0.007) and a reduction of the risk of cancer mortality about 78% (HR=0.22 [0.08-0.59], p<0.001).

DISCUSSION

The aim of this study was to demonstrate the relationship between AAD exposure and early arterial stiffening. We found that AAD exposure was an important determinant of arterial stiffening, independently of blood pressure changes and with similar magnitude. We then demonstrated that AAD exposure was negatively related to progression free survival and overall survival and we established plasma concentration, which could be used as targets for clinicians to appraise the quality of the exposure to AAD in patients.

The principal finding of this study was the relationship between plasma concentrations of AAD and arterial stiffening. The higher the AAD plasma concentration, the higher the increase of arterial stiffness, independently of BP changes. It has been shown that increased AAD exposure was associated with increased incidence of toxicities^{16,29-30}. Since the kinetic of such changes is fast, it must imply something additional to changes in arterial structure. Indeed, extracellular matrix components (collagen, elastin mainly) have a very slow turnover. The organization of extracellular matrix and its relation with the contractile component is also of importance³¹. The compounds of interest (sorafenib and sunitinib) might interact with attachment proteins such as integrins^{32,33} which have faster kinetic of change than extracellular matrix components. Changes in the bounding of extracellular matrix with intracellular contractile proteins might change the overall properties of the artery³³. The most likely mechanism implied in the stiffening of the large arteries under AAD is through the microvascular effect of AAD. Indeed, large arteries, down to 2 to 3 mm in diameter (coronary arteries) are heavily vascularized. MicroCT studies demonstrate that vasa-vasorum constitute fully developed vascular trees and irrigate the outer media of the arterial wall³⁴. Lesion of the vasa-vasorum by surgical means leads to acute and chronic stiffening of the arterial wall³⁵. The increase of arterial stiffness was large and even more surprising since it was already increased at baseline according to the reference values for PWV. Such increase can be

translated into 10 years of normal aging in only 10 days³⁶. These putative mechanisms can be at play to explain the direct association with AAD concentrations. Indeed, we showed that increase of arterial stiffness was both explained by AAD exposure and by BP increase, independently and with similar magnitude. In the literature, it has been shown that AAD-induced toxicities could be the result of sunitinib exposure, or its metabolite, or both^{16,37}. In this present work it appears that arterial stiffening was more related to concentrations of sunitinib than to its metabolite SU12662. A longer exposure to AAD was not associated with further damage to large arteries. Those results are very important because it is the first attempt to show the pharmacological effect of AAD on large arteries translated by an increase of arterial stiffness probably through a destruction of the vasa-vasorum and a reorganization of the extracellular matrix components.

Those results were confirmed in a subgroup of patients treated with sunitinib for renal cell carcinoma (N=22). Those analyses were not pre-specified and are only indicative.

We did not find subsequent changes in wave reflection during follow-up, but changes in some patients could have been masked by the mean. We did not find either a relationship between augmentation index changes and plasma concentrations of AAD. Augmentation index is a complex parameter, mostly related to the magnitude of arterial wave reflection. Wave reflection is increased by the tapering of the aortic tree, the high pulse wave velocity (early wave reflection), the compliance mismatch, the inotropic state of the left ventricle and the peripheral resistances^{38,39}. Thus, this parameter might not reflect the effect of AAD on the tumor microcirculation.

We confirmed the results of the meta-analysis from Houk et al¹⁶ which demonstrated that increased exposure of sunitinib or sorafenib was associated to a better efficiency of AAD translated by a longer time to progression and a longer overall survival. Indeed in our study

we showed that an increase of mean plasma concentration of 2.5mg/l of sorafenib or 21.6 mg/l of sunitinib was associated with a reduction of risk of progression about 40% (RR = 0.60 [0.38-0.97], p=0.035). In patients treated with sunitinib, exposure to sunitinib seemed to be more associated with a reduction of the progression than exposure to its metabolite SU12662, indeed the exposure to the metabolite was not related to cancer progression. Moreover, the metabolite seemed to mask the effect of the sunitinib, since we did not find a relationship between the plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 and cancer progression. Same results were found on overall survival, an increase of plasma concentration of 2.5mg/l of sorafenib or 21.6µg/l of sunitinib was associated with a reduction of the risk of mortality about 62% (HR = 0.38 [0.19-0.79], p=0.01). The effect of sunitinib on mortality is larger than on progression and consequently not masked by the absence of effect of its metabolite.

On a subgroup of patients treated with sunitinib for a renal cell carcinoma, we showed that increase plasma concentration of sunitinib and its metabolite seemed to be associated with a reduction of the risk of mortality at 6 month follow-up but the results did not reached the statistical significance (P=0.062 and 0.061 respectively). On the other hand, an increase of the plasma concentration of the total drug sunitinib+SU12662 was significantly associated with a reduction of the risk of mortality (RR=0.21 [0.06-0.77], p=0.019). Similar results were found for cancer progression. Those results reflect the synergy between the effect of sunitinib and the effect of its metabolite on the tumor environment leading to a better efficiency of the total drug in renal cell carcinoma. The contrast with the result on the total population of this study testify of the difference between solid tumors and thus the difference of effect of sunitinib and its metabolite on solid tumors. But further studies are needed to understand the physiopathology of large artery damage induced by AAD and cancer progression.

In a previous work¹³ we showed that early increase in PWV was associated with a higher risk of progression (HR=1.24 [1.01-1.51], p=0.042). In this present study we showed that arterial stiffening was explained by increased plasma concentration of AAD. But plasma concentration was negatively related to cancer progression. This discordance can be explained by the fact that arterial stiffening reflects an external effect of AAD which is not related to the effect on the vascularization of the tumor.

It is now clear, that better is the exposure to AAD, better will be the efficiency of those treatments. However, an over-exposure to AAD is also associated with an increase of the incidence and the severity of toxicities¹⁶, leading to reduction of the doses and even termination of the treatment. Determine target concentrations to discriminate patients under-exposed and patients over-exposed would be useful to improve the efficiency of AAD therapies. A preliminary study demonstrated on 29 patients treated with sunitinib for various solid tumors the feasibility of doses adjustment based on plasma concentrations without additional toxicities⁴⁰. In this purpose, we established a threshold which could help the clinician to discriminate patients under-exposed from the others and who could benefit of escalation doses if the tolerability is good. A cut-off at -0.5SD of the mean concentration of sunitinib or sorafenib had a very good sensitivity and weak specificity for cancer progression, but a very good sensitivity and a good specificity for mortality. In other words, patients who had a plasma concentration lower than 3.7mg/l of sorafenib and 51.7µg/l for sunitinib were under-exposed. Using this threshold, patients correctly exposed to AAD had a reduction of the risk of progression and mortality in comparison with patients under-exposed (HR=0.41 [0.19-0.87], p=0.007 and HR=0.22 [0.08-0.59], p<0.001 respectively). The sorafenib plasma concentration cut-off at 3.7mg/l proposed in this present study seemed to be in agreement with the literature, since it has been shown that plasma concentrations over 5.78mg/l predicted the development of grade ≥ 2 hand-foot skin reaction and plasma concentrations over

4.78mg/l predicted hypertension³⁰. The therapeutic window might turn out short making the doses adjustment difficult.

To conclude, this present study showed early modifications of the large artery elastic properties under AAD which were explained in part by the exposure to AAD independently of BP changes. Increase in plasma concentration of AAD was associated with an improvement of the efficiency end-points. And we revealed a cut-off concentration to predict AAD efficacy (3.7mg/l for sorafenib and 51.7µg/l for sunitinib).

REFERENCES

1. Le Tourneau C, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumor. *Cancer Treat Rev* 2008;34(1):37-48.
2. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-7109.
3. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P, Raymond E. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(1):25-35.
4. Eichholz A, Merchant S, Gaya AM. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Onco Targets Ther.* 2010;3:69-82.
5. Blumenthal GM, Cortazar P, Zhang JJ, Tang S, Sridhara R, Murgo A, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist.* 2012;17(8):1108-1113.
6. Wu S, Chen JJ, Kudelka A, Lu J, Zhu X. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2008;9(2):117-123.
7. Mir O, Coriat R, Cabanes L, Ropert S, Billefont B, Alexandre J, Durand JP, Treluyer JM, Knebelmann B, Goldwasser F. An observational study of bevacizumab-induced hypertension as a clinical biomarker of antitumor activity. *Oncologist.* 2011;16(9):1325-1332.
8. Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2009;48(1):9-17.
9. Bussy C, Boutouyrie P, Lacolley P, Challande P, Laurent S. Intrinsic stiffness of the carotid arterial wall material in essential hypertensives. *Hypertension.* 2000;35(5):1049-1054.
10. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension.* 1995;26(2):355-362.
11. Benetos A, Laurent S, Asmar RG, Lacolley P. Large artery stiffness in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1997;15(2):S89-97.

12. Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS, Mitchell GF. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *JAMA*. 2012;308(9):875-881.
13. Alivon M, Giroux J, Briet M, Goldwasser F, Laurent S, Boutouyrie P. Hypertension after antiangiogenic drugs: changes in arterial mechanical properties and association with cancer progression and mortality. *J hypertens* 2014
14. Sakamoto KM. Su-11248 Sugén. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5(12):1329-1339.
15. Bello CL, Sherman L, Zhou J, Verkh L, Smeraglia J, Mount J, Klamerus KJ. Effect of food on the pharmacokinetics of sunitinib malate (SU11248), a multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor: results from a phase I study in healthy subjects. *Anticancer Drugs*. 2006;17(3):353-358.
16. Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(2):357-371.
17. La Vine DB, Coleman TA, Davis CH, Carbonell CE, Davis WB. Frequent dose interruptions are required for patients receiving oral kinase inhibitor therapy for advanced renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2010;33(3):217-220.
18. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-655.
19. Mir O, Coriat R, Ropert S, Cabanes L, Blanchet B, Camps S, Billemont B, Knebelmann B, Goldwasser F. Treatment of bevacizumab-induced hypertension by amlodipine. *Invest New Drugs*. 2012;30(2):702-707.
20. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancy J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247.
21. Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger JN, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Circulation*. 2004;109(12):1530-1535.
22. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-2605.
23. Collaboration RVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010;31(19):2338-2350.

24. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FU, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens.* 2012;30(3):445-448.
25. Di Gion P, Kanefendt F, Lindauer A, Scheffler M, Doroshenko O, Fuhr U, Wolf J, Jaehde U. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(9):551-603.
26. Blanchet B, Billefont B, Cramard J, Benichou AS, Chhun S, Harcouet L, Ropert S, Dauphin A, Goldwasser F, Tod M. Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(4):1109-1114.
27. Blanchet B, Saboureau C, Benichou AS, Billefont B, Taieb F, Ropert S, Dauphin A, Goldwasser F, Tod M. Development and validation of an HPLC-UV-visible method for sunitinib quantification in human plasma. *Clin Chim Acta.* 2009;404(2):134-139.
28. Ong KT, Delerme S, Pannier B, Safar ME, Benetos A, Laurent S, Boutouyrie P. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens.* 2011;29(6):1034-1042.
29. Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, Thomas-Schoemann A, Mir O, Taieb F, Durand JP, Coriat R, Dauphin A, Vidal M, Tod M, Lorient MA, Goldwasser F, Blanchet B. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS One.* 2012;7(8):e42875.
30. Fukudo M, Ito T, Mizuno T, Shinsako K, Hatano E, Uemoto S, Kamba T, Yamasaki T, Ogawa O, Seno H, Chiba T, Matsubara K. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(2):185-196.
31. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension.* 2005;45(6):1050-1055.
32. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z, Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(4):H2597-2604.
33. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension.* 2014;63(3):520-526.

34. Gossel M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(5):H2019-2026.
35. Osada H, Kyogoku M, Ishidou M, Morishima M, Nakajima H. Aortic dissection in the outer third of the media: what is the role of the vasa vasorum in the triggering process? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;43(3):e82-88.
36. Alghatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG. Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2013;62(5):934-941.
37. Teo YL, Chong XJ, Chue XP, Chau NM, Tan MH, Kanesvaran R, Wee HL, Ho HK, Chan A. Role of sunitinib and SU12662 on dermatological toxicities in metastatic renal cell carcinoma patients: in vitro, in vivo, and outcomes investigation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73(2):381-388.
38. Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens*. 2005;18(1 Pt 2):3S-10S.
39. Sharman JE, Davies JE, Jenkins C, Marwick TH. Augmentation index, left ventricular contractility, and wave reflection. *Hypertension*. 2009;54(5):1099-1105.
40. Lankheet NA, Kloth JS, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Cirkel GA, Mathijssen RH, Lolkema MP, Schellens JH, Voest EE, Sleijfer S, de Jonge MJ, Haanen JB, Beijnen JH, Huitema AD, Steeghs N. Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2441-2449.

Figure 1. Flow chart

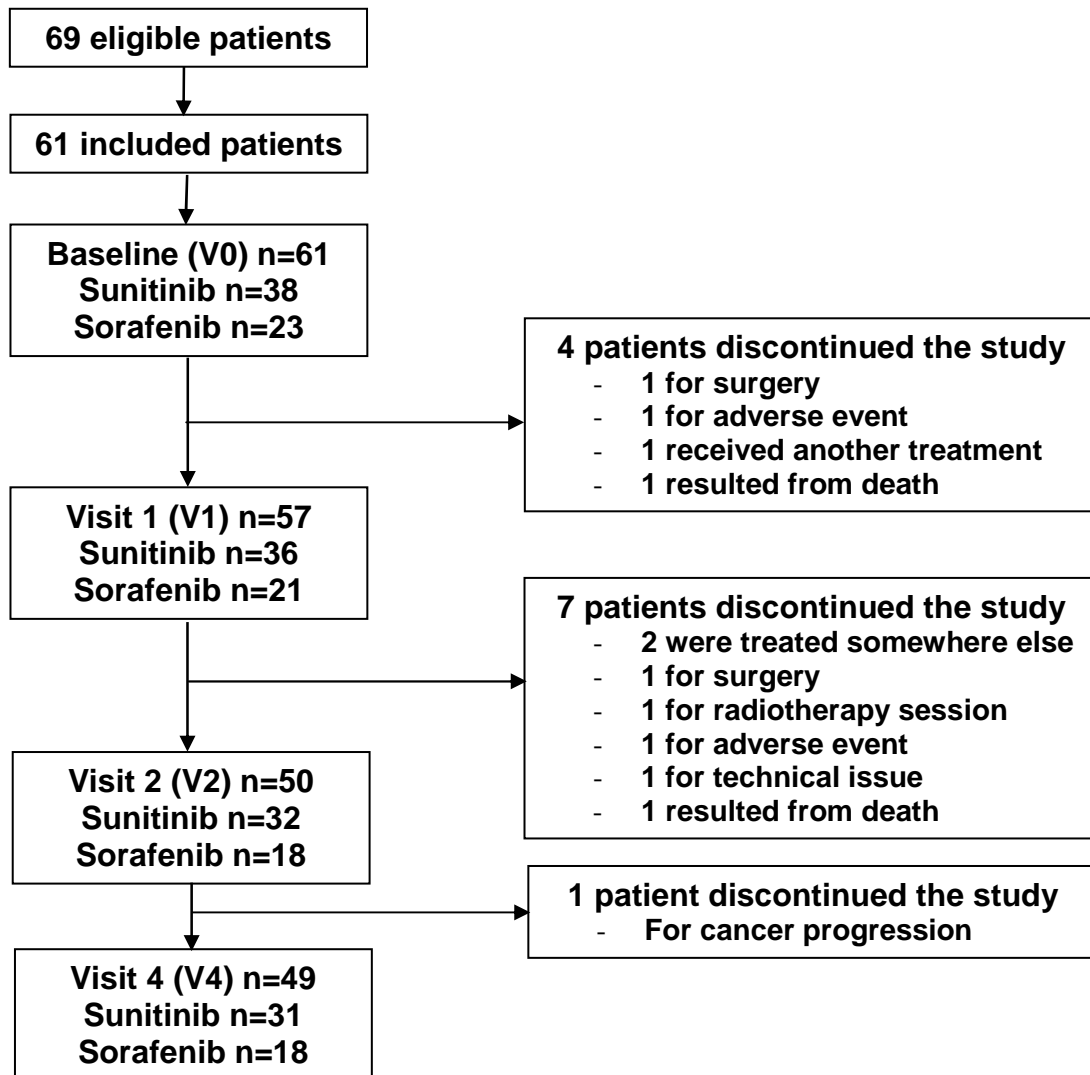


Table 1. Characteristics of the population in patients treated with sunitinib and patients treated with sorafenib

	Sunitinib N=38	Sorafenib N=23	P-value
Clinic			
Gender (% male/female)	54/46	82/18	-
Age (yrs)	59 ± 15	57 ± 14	NS
Height (m)	1.70 ± 0.11	1.74 ± 0.08	NS
Weight (kg)	72 ± 14	79 ± 13	NS
Body mass index (kg.m ⁻²)	25 ± 4	26 ± 4	NS
Heart Rate (bpm)	75 ± 16	80 ± 14	NS
Brachial Systolic blood pressure (mmHg)	127 ± 19	128 ± 20	NS
Brachial Diastolic blood pressure (mmHg)	74 ± 9	75 ± 14	NS
Brachial Mean blood pressure (mmHg)	94 ± 13	96 ± 16	NS
Brachial Pulse Pressure (mmHg)	53(15)	53(10)	NS
Hypertension (n, %)	15(39)	9(39)	NS
Dyslipidemia (n, %)	11(29)	7(30)	NS
Diabetes (n, %)	5(13)	3(13)	NS
Central blood pressure			
Aortic Systolic blood pressure (mmHg)	116 ± 20	115 ± 19	NS
Aortic Pulse Pressure (mmHg)	40 ± 15	37 ± 10	NS
Aortic Augmentation index (%)	25 ± 13	23 ± 15	NS
Aortic Augmentation index @75 (%)	22 ± 10	21 ± 11	NS
Aorta			
Pulse wave velocity (PWV _{0,8}) (m.s ⁻¹)	10.0 ± 2.7	9.6 ± 1.7	NS
Medication			
Antihypertensive (n, %)	15(39)	9(39)	NS
Statins (n, %)	8(21)	6(26)	NS
Diabetes treatment (n, %)	5(13)	3(14)	NS

Values are given as mean ± SD or as number of participants (with corresponding percentages).

Table 2. Time-course of blood pressure and arterial stiffness during follow-up

	V0	V1	V2	V4	Overall P-value
bSBP	127 ± 20	136 ± 21*	136 ± 15*	133 ± 17*	<0.001
bDBP	75 ± 11	81 ± 11*	81 ± 11*	79 ± 10*	<0.001
bMBP	95 ± 14	100 ± 14*	100 ± 11*	99 ± 12	0.005
cSBP	116 ± 19	127 ± 23*	125 ± 15*	123 ± 20*	<0.001
CF-PWV_{0.8}	9.9 ± 2.4	10.8 ± 3.1*	10.7 ± 2.7*	10.1 ± 2.2	0.002
Alx	24 ± 14	27 ± 12	27 ± 12	25 ± 12	NS

bSBP: brachial systolic blood pressure

bDBP: brachial diastolic blood pressure

bMBP: brachial mean blood pressure

cSBP: central systolic blood pressure

CF-PWV_{0.8}: carotid-to-femoral pulse wave velocity adjusted to a factor 0.8

Alx: Augmentation index

*: P-value <0.05

Table 3. Plasma concentrations of sorafenib, sunitinib and total drugs (sunitinib+SU12662) during follow-up.

	V2		V4		P-value
	mean ± SD	Median [min-max]	mean ± SD	Median [min-max]	
Sorafenib (mg/l)	5.0 ± 2.5	4.5[1.3-10.8]	5.0 ± 3.0	5.1[0.6-10.9]	NS
Sunitinib (µg/l)	62.3 ± 25.8	58.5[17.3-114.3]	64.8 ± 29.4	59.6[22.2-147.9]	NS
Sunitinib + SU12662 (µg/l)	98.0 ± 41.0	91.0[27.5-186.4]	98.0 ± 42.3	97.5[22.2-195.7]	NS
Sorafenib cumulative concentrations (mg/l)	75 ± 45	74[9-180]	179 ± 119	199[9-439]	<0.001
Sunitinib cumulative concentrations (µg/l)	1116 ± 418	1071[293-1929]	2071 ± 1011	1850[461-4949]	<0.001

Table 4. Determinants of arterial stiffness changes between V0 and V2

ΔVOP_{0-2}	Standard Coef	P-value	R² increment
Z-[AAD] _{plasm}	0.37	<0.01	0.13
Δ_{0-2} brachial MBP (mmHg)	0.35	<0.01	0.11
BL CF-PWV (m/s)	-0.35	<0.01	0.10
Follow-up (days)		NS	0
Sunitinib/Sorafenib (1/2)		NS	0
ΔVOP_{0-4}	Standard Coef	P-value	R² increment
Δ_{0-4} brachial MBP (mmHg)	0.4337	<0.01	0.19
Z-[AAD] _{plasm}	0.3829	0.01	0.15
Follow-up (days)		0.07	0.07
Sunitinib/Sorafenib (1/2)		NS	0.01
BL PWV (m/s)		NS	0

Z-[AAD]_{plasm} : Standardized plasma concentration of AAD (sorafenib and sunitinib)

Δ_{0-2} brachial MBP: changes in brachial mean blood pressure between V0 and V2

Δ_{0-4} brachial MBP: changes in brachial mean blood pressure between V0 and V4

BL CF-PWV: Carotid-to-femoral pulse wave velocity at baseline

Table 5. Values of means of concentration and standard deviation between V1 and V4 of sunitinib, sunitinib+SU12662 and sorafenib.

SD	Sunitinib (µg/l)	Sunitinib + SU12662 (µg/l)	Sorafenib (mg/l)
-1	40.9	62.2	2.4
-0.5	51.7	79.6	3.7
Mean	62.5	97.0	4.9
+0.5	73.3	114.4	6.2
+1	84.1	133.8	7.4

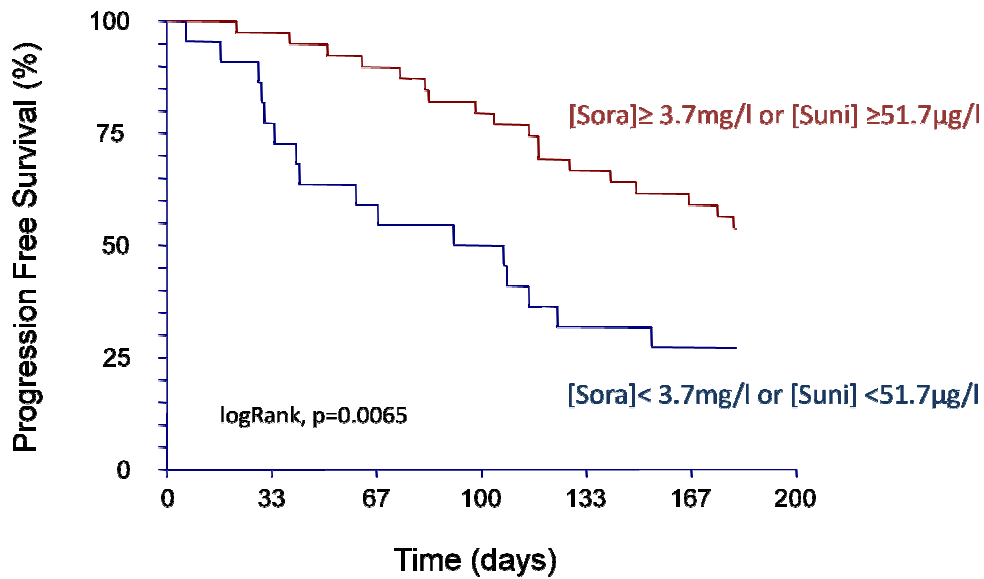
Table 6. Predictive value of AAD exposure on progression and overall survival at 6 months follow-up.

	Parameters	Regression Coef	95% CI	P-value
Progression	Mean Z [AAD] _{plasm}	0.60	0.38 – 0.97	0.035
	BL bMBP	1.00	0.97 – 1.03	NS
	age	1.01	0.99 – 1.04	NS
Overall survival	Mean Z [AAD] _{plasm}	0.38	0.19 – 0.79	0.010
	BL bMBP	1.00	0.96 – 1.04	NS
	age	1.03	0.99 – 1.07	NS

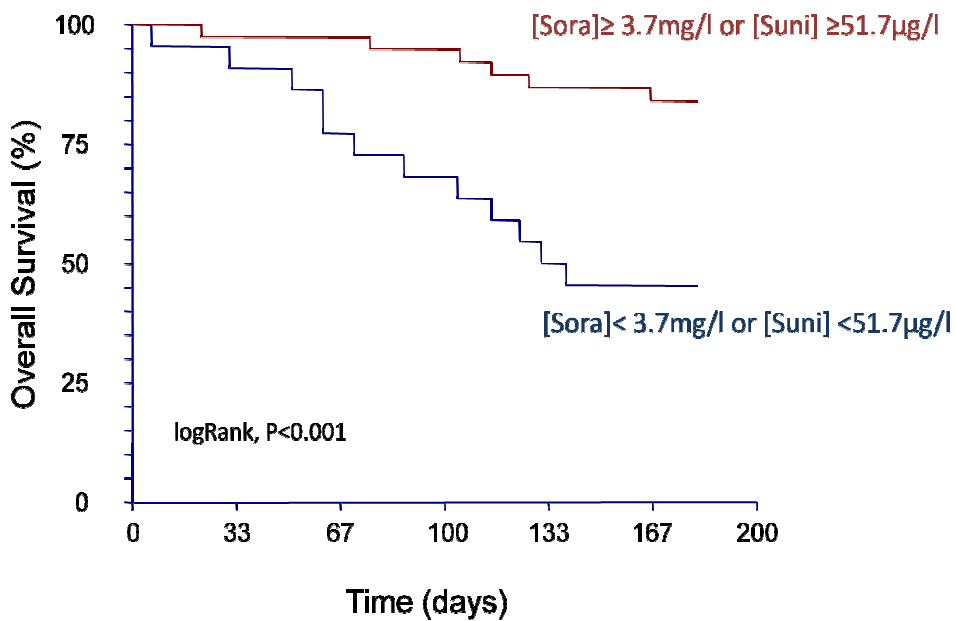
Mean Z[AAD]_{plasm} : mean of standardized plasma concentrations of AAD between V1 and V4 (sorafenib and sunitinib)

BL bMBP : brachial mean blood pressure at baseline

Figure 2. Kaplan Meier curves of progression free survival (a) and overall survival (b) according to sorafenib or sunitinib exposure in all patients.



a.



b.

Red line indicated patients who achieved mean plasma concentration of sorafenib and sunitinib $\geq 3.7 \text{ mg/l}$ and $51.7 \mu\text{g/l}$ respectively

Blue line indicated patients who did not achieve the threshold concentration

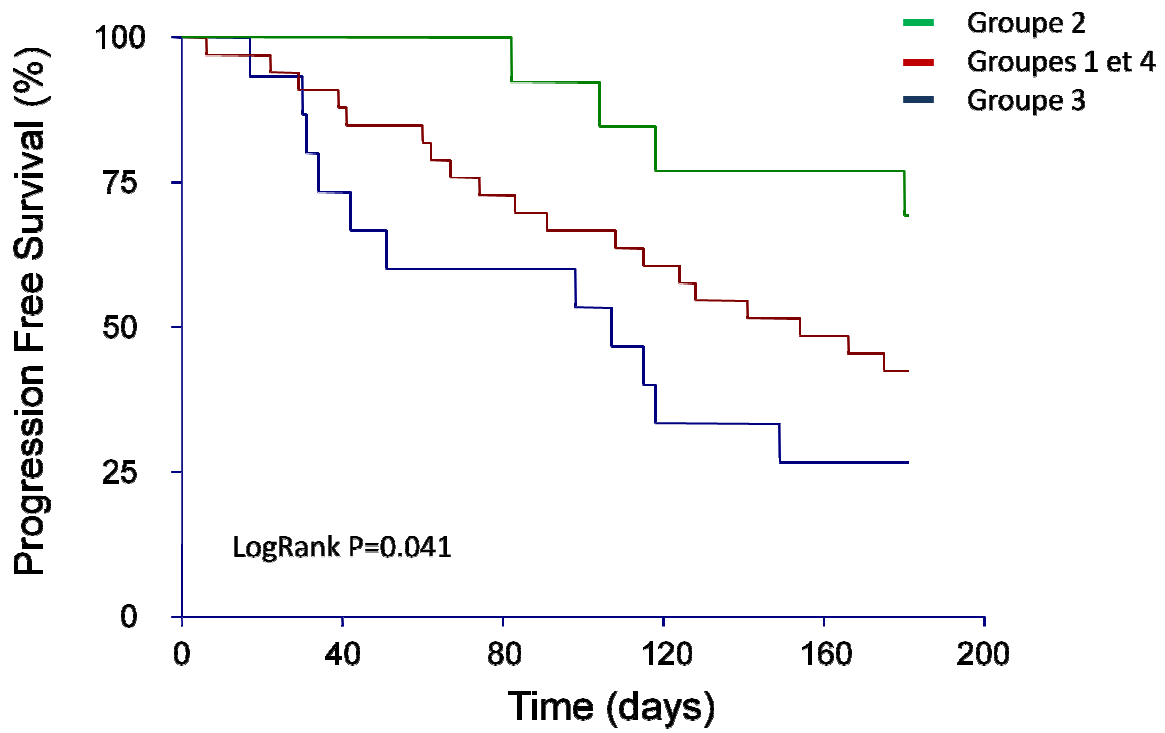
Tableau 7. Cross tabulation showing distribution of progression events according to AAD plasma concentrations and arterial stiffness changes between V0 and V1

		AAD plasma concentrations	
		< mean Z[AAD] _{plasm}	≥ mean Z[AAD] _{plasm}
ΔPWV₀₋₁	ΔPWV < median=0.9 m/s	Group 1 : 12/20 (60%)	Group 2 : 4/13 (30%)
	ΔPWV ≥ median=0.9 m/s	Group 3 : 11/15 (73%)	Group 4 : 7/13 (54%)

Mean Z[AAD]_{plasm} : mean of standardized plasma concentrations of AAD (sorafenib and sunitinib)

Δ₀₋₁ PWV: changes in pulse wave velocity between V0 and V1

Figure 3. Kaplan-Meier curves of progression free survival according to AAD plasma concentrations and arterial stiffness changes



Supplemental table 1. Sunitinib and Sorafenib daily administrated doses during follow-up

	N	SUNITINIB							
		V0	V1		V2		V3		V4
		Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7
Unchanged treatment N=21	13	0	50	50	50	50	0	0	50
	5	0	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
	1	0	25	25	25	25	25	25	25
	1	0	50	50	0	50	50	0	50
	1	0	37,5	37,5	37,5	0	0	0	37,5
Increasing doses N=1	1	0	25	25	25	25	25	0	37,5
Decreasing doses N=3	1	0	50	50	50	50	0	0	37,5
	1	0	25	25	25	0	12,5	12,5	12,5
	1	0	50	50	50	50	50	0	37,5
Premature termination N=13	1	0	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	0
	1	0	37,5	37,5	37,5	0	0	0	0
	1	0	50	50	0	0	37,5	37,5	0
	3	0	50	50	50	50	0	0	0
	1	0	50	50	0	0	0	0	0
	2	0	37,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	0	0
	1	0	25	25	25	25	25	0	0
	1	0	37,5	37,5	37,5	37,5	0	0	0
SORAFENIB									
	N	V0	V1		V2		V3		V4
		Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7
Unchanged treatment N=7	5	0	800	800	800	800	800	800	800
	2	0	400	400	400	400	400	400	400
Increasing doses N=5	1	0	600	600	600	1000	1000	1200	1200
	1	0	800	800	800	1200	1200	1200	1200
	1	0	400	400	400	400	400	400	800
	1	0	200	400	400	400	400	400	400
	1	0	800	800	800	800	800	1200	1200
Decreasing doses N=2	1	0	800	800	800	0	400	400	400
	1	0	800	800	800	800	800	0	400
Premature termination N=9	1	0	800	800	800	1000	1000	800	0
	2	0	800	800	800	800	800	0	0
	3	0	400	0	0	0	0	0	0
	3	0	800	0	0	0	0	0	0

DISCUSSION

1. Modifications des propriétés mécaniques des grosses artères sous traitement AAD

- **Discussion article 1**

***Conclusion 1 :** Il existe une atteinte précoce des grosses artères traduite par une augmentation de la rigidité artérielle et un remodelage externe de la paroi des gros vaisseaux en partie indépendante des changements pression artérielle.*

Dans ce premier travail, nous avons observé que des modifications des propriétés des grosses artères opéraient dès la première semaine d'exposition au traitement se traduisant par une augmentation cliniquement significative de la pression brachiale, de la pression centrale et de la rigidité artérielle de même qu'un remodelage externe de la carotide commune. C'est modifications sont en partie pression indépendante. L'augmentation précoce de la pression brachiale est bien connue chez les patients traités par AAD (64,150), en revanche les modifications des propriétés élastiques et du remodelage des grosses artères n'avaient jamais été rapportées. Notons que dans cette étude l'augmentation moyenne de pression systolique la plus importante au cours du suivi est observée à V1, c'est-à-dire après 7 à 10 jours de traitement seulement ($+9.6 \pm 15.2$ mmHg, $p < 0.001$) et maintenue à des valeurs élevées pendant tout le suivi. Cette augmentation de la pression systolique est moins importante que celle rapportée dans la littérature avec une augmentation moyenne de 14.5 mmHg en se basant sur les résultats d'une dizaine d'études rapportant la différence de pression observée avant et pendant un traitement AAD (64,73 122, 150-155). La pression artérielle diastolique suit la même évolution, avec une augmentation significative après seulement 7-10 jours de traitement ($+6.4 \pm 8.8$ mmHg, $p < 0.001$), et maintenue élevée durant tout le suivi de deux mois (V0-V4 : $+4.0$ mmHg, $p = 0.016$). Après la V1, certains patients ayant développé de l'hypertension artérielle sont traités par amlodipine, on note alors une légère diminution des valeurs de pression mais sans retour aux valeurs initiales pour la pression systolique (V0-V4 : $+5.8$ mmHg, $p = 0.047$) et pour la pression diastolique (V0-V4 : $+4.0$ mmHg, $p = 0.016$). Ces résultats suggèrent un possible manque d'efficacité du traitement de l'hypertension par l'amlodipine ou le défaut d'introduction d'un traitement antihypertenseur chez des patients à la limite de la décision thérapeutique. En parallèle de l'augmentation de la pression brachiale,

nous observons une augmentation de la pression centrale dès la première semaine de traitement. Cette augmentation de la pression centrale est même légèrement plus importante que celle de la pression périphérique avec une augmentation de $+12.2 \pm 16.8$ mmHg ($p < 0.001$) après 7-10 jours de traitement et maintenue tout le long du suivi de deux mois. Même après ajustement aux modifications de la pression systolique brachiale, l'augmentation à V1 reste significative avec $+5.8$ mmHg ($p < 0.01$). Ces modifications de la pression centrale sont du même ordre de grandeur que la baisse de pression artérielle sous traitement antihypertenseurs, lequel s'accompagne d'un bénéfice indiscutable dans le traitement de l'hypertension essentielle. **(156,157)** On peut donc en conclure que cette augmentation de pression sous AAD pourrait avoir des conséquences délétères.

Le deuxième point important est l'augmentation importante de la rigidité artérielle en seulement 7 à 10 jours d'exposition, nous observons une augmentation de $+1.1 \pm 2.2$ m/s pour la VOP et $+1.0 \pm 1.7$ m/s pour la rigidité carotidienne. Même après ajustement à la pression artérielle, l'augmentation reste significative pour la VOP et pour la rigidité carotidienne avec $+0.7$ m/s respectivement. En se basant sur les valeurs de référence de la VOP **(96)**, cette augmentation correspondrait à un vieillissement des artères de 10 ans en 10 jours et est d'autant plus importante que les patients avaient initialement une rigidité artérielle en moyenne élevée 10.0 ± 2.3 m/s, ce qui correspond au 80^e percentile des valeurs de référence pour une population de cette tranche d'âge. A partir de la visite V2, nous observons une diminution des valeurs de rigidité, très probablement en lien avec l'introduction d'amlodipine chez certains patients mais également du fait de la fenêtre thérapeutique qui se produit autour de la V3 pendant laquelle la majorité des patients traités par sunitinib ne reçoivent pas de traitement. Néanmoins à la dernière visite V4, si la VOP a presque retrouvé son niveau initial, la rigidité carotidienne reste élevée à des niveaux similaires à ceux de V1. Cette différence de comportement de ces deux segments artériels peut s'expliquer par les différences structurales entre la carotide et l'aorte. L'aorte étant plus élastique que la carotide. Une augmentation de la rigidité artérielle aussi rapide et aussi importante nous amènent à pencher plus pour des modifications tissulaires qui opèreraient au niveau de la matrice-extracellulaire (MEC) en addition à des modifications structurales plus tardives. En effet les modifications structurales dépendent de la composition des grosses artères principalement constituées de collagène et d'élastine qui ont un recrutement lent, ce qui fait que les effets sur la rigidité de la paroi artérielle ne seraient observables qu'après quelques mois. L'organisation de la MEC et sa relation avec les constituants de la paroi des grosses artères ont également leur importance

(158). Les AAD peuvent également avoir des propriétés vasoconstrictrices (159) et pourraient interagir avec les protéines d'adhésions, principalement les intégrines (160,161) qui ont une cinétique plus rapide que le recrutement de collagène. Les modifications qui opèrent au niveau de la MEC agissant sur la cohésion des cellules pourraient modifier les propriétés élastiques des grosses artères et expliquer l'augmentation de rigidité artérielle (161) Un argument supplémentaire qui pencherait en faveur des modifications tissulaires plutôt que des modifications structurales au niveau de la paroi artérielle est la réversibilité à l'arrêt du traitement. Nous observons une diminution importante de la rigidité carotidienne et de la VOP à la visite V3, visite à laquelle la majorité des patients traités par sunitinib sont en pause thérapeutique. Une fois le traitement repris, la rigidité carotidienne et la pression brachiale et centrale sont de nouveau augmentée à V4. Un autre mécanisme plausible qui serait impliqué dans l'augmentation de rigidité sous AAD serait l'action de ces traitements sur les petits vaisseaux. En effet les artères de calibre inférieur à 2-3mm comme les coronaires sont très vascularisées. Des études utilisant la microtomographie à rayon X (micro-CT) ont montré dans des modèles animaux qu'un vaste réseau de vasa-vasorum irriguait la média externe de la paroi artérielle (162) que des lésions de ces vasa-vasorum entraînaient une augmentation rapide et constante de la rigidité de la paroi artérielle accompagnée d'un risque de dissection. (163,164) Il a également été montré que des lésions des vasa-vasorum anormalement développés dans la plaques d'athérosclérose pouvaient induire de l'inflammation et une déstabilisation de la plaque pouvant aller jusqu'à la rupture et l'accident thrombotique. (165) Dans les études d'efficacité et de tolérance des AAD, il a été mis en évidence que la fréquence d'évènements thrombotiques artériels était augmentée principalement chez les patients traités par sorafenib. (58) Il est donc probable qu'une atteinte des vasa-vasorum imputée à la prise d'AAD soit impliquée dans l'incidence de ces évènements indésirables. Un troisième mécanisme pourrait être impliqué dans l'augmentation rapide de rigidité artérielle et serait la diminution de la biodisponibilité d'oxide nitrique (NO) par inhibition de l'effet du VEGF sur les cellules endothéliales par les AAD. Cette diminution de NO se traduirait par une vasoconstriction des vaisseaux de la microcirculation mais également au niveau des gros vaisseaux. Cependant, ce mécanisme ne va pas dans le sens de nos résultats puisque nous observons une augmentation soutenue du diamètre carotidien tout au long du suivi et maintenue significative même après ajustement aux changements de pression. Cette vasodilatation est croissante tout au long du suivi de deux mois, en dépit de l'introduction d'amlodipine chez certains patients. En supposant que les AAD induisent de l'hypoxie au sein de la tumeur, cette hypoxie localisée pourrait entraîner une libération de facteurs

vasodilatateurs dans la circulation systémique. L'augmentation de l'activité sympathique supposée se produire dans les semaines après le début des conditions hypoxiques (166) est probablement masquée par l'introduction d'amlodipine qui va avoir un effet vasorelaxant sur les grosses artères. (167) Cependant, cette augmentation continue du diamètre durant le suivi n'est pas expliquée par l'introduction de l'amlodipine lorsqu'on intègre ce facteur dans le modèle statistique. Une autre explication pourrait de nouveau venir du fait que les AAD entraînent une ischémie de la média externe par une destruction des vasa-vasorum, ce qui a pour conséquence au long terme une fibrose de la média (121). Nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier l'ischémie de la média sous AAD, mais il est très probable qu'il y ait une importante atteinte des cellules musculaires lisses entraînant une fragilité de la paroi artérielle qui ne permet pas de résister au stress qui s'y applique. Dans les modèles animaux, la fibrose qui est supposée se développer après la lésion des vasa-vasorum opère probablement trop tard pour compenser la fragilité de la paroi, expliquant la tendance à la dissection de la paroi artérielle (163). Si cette hypothèse est vérifiée chez l'homme, la dilatation de la carotide serait un signe précoce d'une atteinte irréversible de la paroi des grosses artères chez les patients traités par AAD et cette atteinte devrait être prise en compte du fait de la tendance à l'augmentation de l'espérance de vie chez ces patients. Cependant nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier les variations de diamètre à distance de la cure l'AAD pour juger de l'irréversibilité de ce phénomène. L'augmentation importante du diamètre carotidien ne s'accompagne pas de modifications de l'épaisseur intima-média, en dépit de l'introduction d'amlodipine au cours du suivi, probablement en raison du court suivi.

De manière surprenante nous n'avons pas observé de modifications des ondes de réflexion par la mesure de l'index d'augmentation au cours du suivi, alors qu'on s'attendait à une augmentation de celles-ci. En effet, dans la littérature, il est rapporté une atteinte de la microcirculation par les AAD, au travers d'une raréfaction capillaire, d'une dysfonction endothéliale et d'une vasoconstriction (55, 72-74) qui auraient pour conséquence une amplification des ondes de réflexion. Cependant, l'index d'augmentation est un paramètre complexe influencé par de nombreux facteurs. Nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier directement la microcirculation des patients atteints de cancer. Bien que nous avons investi dans un appareil rétinographe laser pour mesurer le remodelage des artères de rétine, malgré des mois de travail cet appareil n'a jamais fonctionné et nous n'avons pas pu faire ce travail nécessaire à la compréhension complète de nos résultats.

2. Influence de l'état des petites et grosses artères avant l'introduction du traitement sur l'augmentation de pression induite par les AAD

Conclusion 2 : Les paramètres de rigidité et d'amplification des ondes de réflexion avant traitement sont des déterminants des modifications de la pression systolique brachiale observées sous AAD

L'augmentation de la pression artérielle et de la rigidité artérielle sont observées après seulement 7 à 10 jours de traitement, le schéma de l'étude ne nous a pas permis de démontrer que l'augmentation de la rigidité artérielle précédait celle de la pression artérielle et par conséquent qu'elle jouait un rôle dans l'augmentation de pression. Cependant nous avons pu montrer au moyen de modèles statistiques que les propriétés mécaniques artérielles étaient associées aux changements de la pression systolique observés après une exposition aux antiangiogéniques.

Les propriétés de la microcirculation au travers des ondes de réflexion et les propriétés des gros vaisseaux au travers de la rigidité artérielle avant l'initiation du traitement AAD prédisent l'augmentation précoce de la pression systolique après 7 à 10 jours de traitement alors que seul le niveau de rigidité artérielle prédit l'augmentation de pression après une exposition chronique aux AAD de 21 jours et plus.

Des ondes de réflexion amples définies par un index d'augmentation (AIx) élevé à l'inclusion étaient associées à une augmentation précoce de la pression systolique. L'index d'augmentation est un paramètre complexe, il dépend de la morphologie plus ou moins conique de l'aorte descendante, de la rigidité artérielle, du débit cardiaque provenant du ventricule gauche, du tonus vasomoteur de la microcirculation et des résistances périphériques (114). Dans cette étude, nous n'avons pas pu disposer d'outils nous permettant une mesure directe de l'état de la microcirculation, par conséquent afin d'utiliser l'index d'augmentation comme un marqueur de la microcirculation nous avons utilisé l'AIx@75 qui est un AIx normalisé à une fréquence cardiaque de 75 bpm pour s'affranchir de l'influence du débit cardiaque et nous avons ajusté à la VOP pour s'affranchir de l'influence de la rigidité artérielle. (116,168) A partir de là, le fait que la morphologie des ondes de réflexion soit un déterminant indépendant de l'augmentation précoce de la pression systolique suggère qu'une atteinte fonctionnelle ou structurale des petites artères avant l'introduction du traitement AAD

réduirait la capacité d'adaptation des petites artères dans les premiers jours de traitement. Nous avons également trouvé que la rigidité artérielle à l'inclusion était associée à une augmentation précoce de la pression systolique sous AAD, cependant cette association était dans le sens opposé par rapport aux ondes de réflexion. En effet, une rigidité artérielle élevée avant l'initiation du traitement était associée à une moindre augmentation de la pression systolique. Cette relation pourrait être le reflet des interactions entre les petites et grosses artères, en effet des altérations des grosses artères traduites par exemple par une augmentation de la rigidité génèreraient une diminution de la compliance, induisant une augmentation de la pulsativité au niveau de la microcirculation (169). Une pression pulsée élevée peut entraîner une hypertrophie, un remodelage et une raréfaction des petits vaisseaux, induisant en retour une augmentation des résistances périphériques. Une atteinte de la microcirculation et des grosses artères pourraient ainsi interférer avec l'action pharmacologique des AAD entraînant une moindre augmentation de la pression artérielle.

L'augmentation de la pression systolique après une exposition chronique aux AAD i.e. après 21 jours de traitement et plus, quand à elle ne dépend plus que de l'état des grosses artères à l'inclusion. Un deuxième mécanisme différent de celui impliqué dans l'augmentation précoce de la pression systolique pourrait être impliqué. En effet plus la rigidité aortique et la rigidité carotidienne sont basses à l'inclusion et plus la pression systolique augmente après 21 jours et plus de traitement. Cette relation pourrait être expliquée par le fait que les grosses artères avec une rigidité moindre seront susceptibles de présenter des modifications au sein de la paroi en conséquence d'une destruction des vasa-vasorum dans la média externe mais également d'un recrutement de collagène et d'une réorganisation de la matrice extracellulaire qui induiraient une augmentation de la rigidité artérielle et par conséquent une augmentation de la pression systolique.

Le rôle principal de l'état de la microcirculation avant l'initiation du traitement dans l'augmentation précoce de la pression systolique reflèterait un état latent qui en réponse à un stimulus comme la prise d'antiangiogénique induirait une augmentation de pression. Alors qu'une augmentation de la pression systolique après une exposition chronique aux AAD dépendrait de l'état des grosses artères à l'inclusion, qui suite à la prise d'AAD seraient le siège de modifications au sein de la paroi artérielle ayant pour conséquence une augmentation de la pression.

3. Relation entre l'augmentation précoce de la rigidité artérielle sous AAD et la progression tumorale

Conclusion 3 : *Une augmentation de la rigidité artérielle précoce sous AAD est associée à un haut risque de progression à 6 mois de suivi.*

La troisième partie de ce travail consistait à étudier l'association entre l'augmentation précoce de rigidité artérielle observée dès 7 à 10 jours de traitement et la progression tumorale. Nous avons montré qu'une augmentation de 1m/s de la rigidité aortique prédisait une augmentation de 24% du risque de progression et une augmentation de 1m/s de la rigidité carotidienne prédisait une augmentation de 34% du risque de progression tumorale. Ce résultat est surprenant car on s'attendait plutôt à ce qu'une augmentation de la rigidité artérielle reflète l'efficacité du traitement au sein de la tumeur et donc serait associée à une moindre progression.

Les vaisseaux tumoraux sont profondément anormaux, tortueux, désorganisés et très perméables, avec une paroi hétérogène avec peu ou pas de cellules endothéliales à certains endroits (**170,171**) La première hypothèse sur l'effet des AAD décrite dans la littérature était qu'ils détruisaient préférentiellement les vaisseaux issus de l'angiogénèse tumorale. Cette vision a été remise en question depuis quelques années avec la mise en avant d'une deuxième hypothèse qui est que le microenvironnement tumoral caractérisé par une forte hypoxie et une haute pression interstitielle due à l'infiltration de liquide favorise la progression tumorale et la résistance aux chimiothérapies (**170,171**). Il a été ainsi montré dans des modèles animaux, que les AAD pouvaient à bonne exposition normaliser la structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques anormaux qui génèrent un microenvironnement hostile par diminution de la perméabilité vasculaire (**172,173**) et une diminution de la surface et de la densité des vaisseaux (**173,174**) entraînant une augmentation du débit sanguin intra-tumoral, réduisant ainsi l'hypoxie et facilitant l'accès des antitumoraux au sein de la tumeur améliorant ainsi le pronostic. Chez des patients atteints de cancer rectal, il a été montré qu'après administration de bevacizumab, le réseau vasculaire tumoral était moins dense mais plus régulier, induisant une augmentation du débit sanguin intra-tumoral (**175**). De plus, dans les essais cliniques évaluant l'efficacité et de tolérance du bevacizumab, il a été montré que l'association du bevacizumab à d'autres chimiothérapies était plus efficace que le bevacizumab seul ou la chimiothérapie seule, c'est la raison pour laquelle le bevacizumab est actuellement dans l'ensemble des indications administré

en association avec d'autres chimiothérapies (26-32). Toutes ces évidences sont en faveur d'une normalisation des vaisseaux par les antiangiogéniques à dose « appropriée ».

Nos résultats sont aussi cohérents avec cette seconde hypothèse concernant l'effet des antiangiogéniques. Une augmentation importante de la rigidité artérielle traduirait un effet excessif des AAD, détruisant les vasa-vasorum et autres petits vaisseaux et entraînant une fibrose au niveau de la paroi artérielle. Cette observation au niveau des grosses artères reflèterait l'effet des AAD au niveau des vaisseaux tumoraux. La fibrose résultante et la destruction des petits vaisseaux pourraient limiter la pénétration du traitement et par conséquent son efficacité, expliquant un plus haut risque de progression chez les patients ayant une augmentation importante de la rigidité artérielle.

Nous avons confirmé la robustesse de nos résultats en faisant une analyse sur un sous-groupe de patients atteint de cancer du rein (N=27). En effet une augmentation précoce de la rigidité carotidienne était associée à une augmentation de 19% du risque de progression à 6 mois de suivi (HR=1.19 [0.81-1.74] P=0.08). Cependant, en raison d'un manque de puissance et du fait que les patients traités par AAD dans le cancer du rein progressent moins rapidement (médiane de progression = 10.7 mois) (176) que d'autres types de cancer, nous n'atteignons pas la significativité statistique avec un p=0.08.

Dans ce travail, nous n'avons pas trouvé d'association entre l'augmentation précoce de la rigidité artérielle et la mortalité liée au cancer.. Ce résultat peu aussi s'expliquer par le fait que près de la moitié des patients qui constituent la cohorte sont des patients traités pour un cancer du rein métastatique pour lequel le sunitinib a montré son efficacité et pour lesquels la médiane de survie est de 23.9 mois. (176) Par conséquent 6 mois est certainement une durée un peu courte pour juger de la mortalité.

Autre résultat important, négatif cette fois, est que nous n'avons pas retrouvé d'association entre l'augmentation de pression et la moindre progression ou mortalité liées au cancer, contrairement à certaines études montrant que l'augmentation de pression était associée à un plus faible risque de progression et de mortalité et proposant ce paramètre comme un marqueur précoce d'efficacité des AAD. Une explication possible est que l'augmentation de pression dans notre étude est plus faible que celle rapportée dans les études positives. La plupart des études positives ont utilisé comme critère une augmentation de +20mmHg de la pression systolique. En se basant sur une dizaine d'articles de la littérature comparant les pressions avant et au cours du traitement, on constate que l'augmentation de pression systolique observée sous AAD est en moyenne de

+14.5 mmHg. D'où le fait que dans notre étude nous ne retrouvons pas d'association avec la progression ou la mortalité puisque nous observons une augmentation maximale de pression systolique moyenne de $+9.6 \pm 15.2$ mmHg et une augmentation maximale de pression diastolique moyenne de $+6.4 \pm 8.8$ mmHg. La pertinence de l'augmentation de +20mmHg de la pression artérielle comme marqueur précoce d'efficacité des traitements AAD est alors remise en question si une faible proportion des patients qui augmentent leur pression artérielle sous AAD est concernée. Même en dichotomisant la variation de pression artérielle, nous n'avons pas trouvé d'association avec ce paramètre.

4. Relation entre l'exposition aux AAD et l'augmentation de rigidité artérielle

- **Discussion article 2**

Conclusion 4 : *L'augmentation de rigidité artérielle observée sous AAD est expliquée par un effet pharmacologique des AAD sur les grosses artères et par l'augmentation de pression artérielle induite par ces traitements.*

La deuxième partie de ce travail de thèse a été principalement consacrée à l'établissement du lien entre la prise d'AAD et l'augmentation de la rigidité artérielle observée au cours du suivi de deux mois. L'exposition au sorafenib et au sunitinib a été estimée par la mesure des concentrations plasmatiques de ces médicaments. Sachant que l'état d'équilibre de ces deux molécules est atteint entre 7 et 14 jours et que la majorité des patients traités par sunitinib ont une pause thérapeutique de deux semaines après un mois de traitement, les visites V1 et V3 n'ont pas été prises en compte.

Les déterminants indépendants de l'augmentation de rigidité artérielle sous AAD au cours du suivi sont l'exposition aux AAD et l'augmentation de pression induite par ces derniers. Plus la pression artérielle augmente, plus la rigidité artérielle augmente. En parallèle, plus la concentration plasmatique des AAD est élevée et plus la rigidité artérielle augmente. Sur un plan clinique, une augmentation d'une déviation standard (14 mmHg) de la pression artérielle moyenne est associée à une augmentation 0.38 m/s de VOP et une concentration plasmatique d'AAD plus élevée d'une déviation standard (sunitinib de 25.5µg/l ou de sorafenib de 2.5mg/l) est associée à une augmentation de la VOP de 0.37m/s entre V0 et V2 (après 20.7 ± 5.8 jours de traitement). Nous retrouvons les mêmes résultats lorsque l'on étudie la relation

entre les modifications de rigidité artérielle et de pression artérielle et l'exposition aux AAD entre V0 et V4 (après 36.9 ± 13.6 jours de traitement). Le sorafenib et le sunitinib semblent avoir le même effet sur les modifications de rigidité artérielle. Dans la littérature des études montrent que les effets secondaires suite à la prise de sunitinib pourraient en partie être dus soit à un effet du sunitinib lui-même soit à un effet de son métabolite actif SU12662 soit à l'action des deux. (177-178) Dans notre travail, il semblerait que l'augmentation de la rigidité soit plus expliquée par un effet du sunitinib lui-même plutôt qu'un effet de son métabolite actif SU12662. Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre l'exposition cumulée aux AAD et l'atteinte artérielle, et ce quelque soit la molécule étudiée. Une plus longue exposition à ces traitements n'est pas associée à une atteinte plus importante des grosses artères. Ces résultats sont importants car ils apportent la première preuve de mise en évidence d'un effet pharmacologique des AAD sur les grosses artères traduite par une augmentation de la rigidité artérielle résultant d'une action sur la paroi artérielle par les mécanismes déjà discutés.

Nous avons vérifié la robustesse de nos résultats dans un sous-groupe de patients atteints d'un cancer du rein, traités par sunitinib et ayant eu les dosages pharmacologiques (N=22). Nous avons retrouvé l'association entre l'exposition au sunitinib et l'atteinte artérielle observée entre V0 et V2. Une concentration de sunitinib augmentée était associée à une augmentation de la rigidité artérielle. Dans ce sous-groupe, l'atteinte artérielle semble également être plus expliquée par l'exposition au sunitinib plutôt qu'à celle de son métabolite. De manière intéressante, dans le cancer du rein traité par sunitinib, l'augmentation de pression n'est plus associée à l'atteinte artérielle, alors qu'il se produit une augmentation significative de la pression artérielle au cours du suivi chez ces patients qui ont tous subi une néphrectomie partielle ou élargie avant l'initiation du sunitinib ($\Delta PAS = +12 \pm 14$ mmHg entre V0 et V1). Ce résultat pourrait traduire une action plus importante des AAD sur les gros vaisseaux dans le cancer du rein.

Dans le premier travail nous avons montré qu'il n'y avait pas de modifications des ondes de réflexion lors du suivi alors que nous nous attendions une augmentation de celles-ci. Cependant nous avons montré que des ondes de réflexion amples antérieures à l'initiation du traitement prédisaient une augmentation précoce de la pression artérielle systolique sous AAD. Nous avons donc étudié la relation entre l'exposition aux AAD et les modifications des ondes de réflexion mais nous n'avons là encore pas trouvé d'association. L'index d'augmentation reflétant l'amplitude des ondes de réflexion est un paramètre complexe

comme nous l'avons expliqué précédemment et ne reflèterait probablement pas l'action des AAD sur la microcirculation tumorale.

5. Relations entre l'exposition aux AAD, la progression et la mortalité liées au cancer

Conclusion 5 : *Une bonne exposition aux AAD est associée à un meilleur pronostic carcinologique. Une concentration plasmatique cible est proposée dans le but d'optimisation l'efficacité de ces traitements.*

Dans le premier travail nous avons étudié la relation entre les modifications de rigidité artérielle et la réponse carcinologique aux AAD, montrant qu'une augmentation précoce et importante de la rigidité artérielle était associée à un risque plus important de progression tumorale. Nous nous sommes donc intéressés dans le deuxième travail à la relation entre l'exposition aux AAD et la réponse carcinologique à ces traitements. Nous avons ainsi confirmé ce qui avait déjà été en partie montré dans la littérature et qui semble intuitif qui est que mieux les patients sont exposés au sorafenib ou au sunitinib meilleur est le pronostic (177)

Nous avons montré qu'une bonne exposition aux AAD était associée à un moindre risque de progression. En effet une concentration plasmatique moyenne augmentée d'une déviation standard (2.5mg/l pour le sorafenib et 21.6µg/l pour le sunitinib) était associée à une réduction du risque de progression à 6 mois de 40% (RR = 0.60 [0.38-0.97], p=0.035). Chez les patients traités par sunitinib, l'efficacité sur la progression tumorale serait plus expliquée par l'action du sunitinib plutôt qu'à celle de son métabolite SU12662. Le métabolite masquerait même l'effet bénéfique du sunitinib sur la progression. En effet nous n'observons plus d'association entre de la concentration plasmatique de la drogue totale sunitinib+SU12662 et la progression tumorale.

Nous avons également montré que plus l'exposition aux AAD était élevée moins le risque de mortalité à 6 mois était important. Pour une concentration plasmatique moyenne augmentée d'une déviation standard (2.5 mg/l pour le sorafenib et 21.6µg/l pour le sunitinib) le risque de mortalité était réduit de 62% (RR = 0.38 [0.19-0.79], p=0.01). La prise en compte du métabolite n'améliore pas la valeur prédictive du sunitinib

Dans un sous-groupe de patients traités par sunitinib pour un cancer du rein, nous avons montré que la concentration plasmatique de sunitinib et celle de son métabolite SU12662 semblaient associées à un moindre risque de progression mais le résultat n'atteignait pas la significativité statistique ($p=0.062$ et 0.061 respectivement). En revanche l'association entre l'exposition à la drogue totale sunitinib+SU12662 et la mortalité liée au cancer était significative. Une concentration composite sunitinib+SU12662 augmentée de $34.5\mu\text{g/l}$ était associée à une réduction du risque de mortalité à 6 mois de 79% (RR=0.21 [0.06-0.77], $p=0.019$). Nous retrouvons des résultats similaires dans la relation avec la progression tumorale. Ces fluctuations dans la significativité sont certainement expliquées par le petit nombre de patients. Cependant, ces résultats témoignent probablement d'une synergie entre les effets du sunitinib et de son métabolite dans le cancer du rein, traduite par une plus grande efficacité dans la réponse carcinologique.

Nos résultats sur l'exposition aux AAD et la progression tumorale sont d'autant plus marquants qu'il est difficile d'établir précisément le statut de progression chez les patients traités par AAD à partir des critères RECIST actuels utilisés par les oncologues. En effet ces critères se basent sur la taille de la tumeur et des métastases et l'apparition de nouvelles lésions pour définir la progression tumorale. Or il a été montré que les AAD ne réduisaient pas forcément la taille de la tumeur, mais induisaient des zones d'ischémie et de la nécrose au sein de celle-ci (179). Il est donc parfois difficile de juger de l'efficacité de ces traitements à partir de ces critères. Et par conséquent, il est plus difficile de trouver une relation entre un marqueur d'efficacité et la progression tumorale. La mortalité est un critère plus robuste. Pour pallier à ce manque, dans les cancers hépatocellulaires les critères RECIST ont été adaptés en prenant en compte l'état de la vascularisation artérielle autour de la tumeur par CT scan pour évaluer l'efficacité du sorafenib. (180,181)

Il est maintenant reconnu que meilleure est l'exposition aux AAD, meilleure est l'efficacité de ces traitements. Cependant une surexposition aux AAD est également associée à une augmentation des toxicités amenant à réduire, voir même à arrêter le traitement. (50,177,182) Le défi des pharmacologues est donc de déterminer un seuil à partir duquel les cliniciens pourraient se baser pour déterminer si le patient est sous-exposé et en l'absence de toxicité, d'adapter les doses dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements AAD. Une étude préliminaire sur 29 patients traités par sunitinib dans divers cancer solides a pu montrer la faisabilité de l'ajustement des doses d'AAD guidé par le dosage des concentrations plasmatiques tout en évitant d'augmenter le risque de toxicités. (183) Dans ce travail notre

dernier objectif était d'établir un seuil cohérent avec les données de la littérature qui permettrait de distinguer les patients sous-exposés pour lesquels le traitement n'est pas efficace. Un seuil fixé à $-0.5SD$ de la concentration moyenne de sunitinib ou de sorafenib a montré une bonne sensibilité pour la progression et la mortalité liées au cancer. Dans le but d'une application clinique, un seuil fixé à une concentration plasmatique de sorafenib de 3.7mg/l de sorafenib et une concentration plasmatique de sunitinib de 51.7 μ g/l paraît intéressant. Les courbes Kaplan Meier ont montré que les patients ayant une concentration plasmatique supérieure ou égale à 3.7mg/l pour le sorafenib et 51.7 μ g/l pour le sunitinib avaient une réduction du risque de progression de 59% (HR=0.41 [0.19-0.87], p=0.007) et une réduction du risque de mortalité de 78% (HR=0.22 [0.08-0.59], p<0.001) par rapport aux patients sous-exposés. La valeur seuil de la concentration plasmatique de sorafenib à 3.7mg/l semble être cohérente avec les quelques données de la littérature, en effet il a été montré qu'une concentration plasmatique de sorafenib supérieure à 5.78mg/l prédisait le développement de syndrome main-pieds de grade ≥ 2 et une concentration plasmatique supérieure à 4.78mg/l prédisait le développement d'hypertension artérielle sous sorafenib. (50) Au vue de ces résultats, il se pourrait que la fenêtre thérapeutique des AAD alliant efficacité tout en évitant l'augmentation des toxicités, soit étroite, rendant le travail d'ajustement des doses difficile.

6. Relations entre l'atteinte artérielle, l'exposition aux AAD et la progression tumorale

Conclusion 6

Dans ce travail de thèse nous avons montré que l'atteinte artérielle sous AAD était positivement associée au risque de progression. Que plus la concentration plasmatique des AAG était élevée, plus la VOP augmentait, mais que les concentrations plasmatiques d'AAD étaient négativement associées au risque de progression. Ces résultats sont apparemment incompatibles, cependant, il est possible que ce soient les cas discordants (forte exposition + faible augmentation de VOP ou faible exposition + forte augmentation de VOP) qui déterminent l'association. En étudiant la répartition des événements de progression en fonction des changements de VOP et des concentrations plasmatiques nous avons mis en évidence que les patients bien exposés qui n'avaient pas d'atteinte importante des grosses artères progressaient moins que les patients insuffisamment exposés aux AAD qui augmentant

de manière importante leur VOP, avec une réduction du risque de progression de 74% (HR= 0.26 [0.09-0.73], p=0.04).

Tout d'abord ces résultats mettent en évidence l'hétérogénéité des effets des AAG au niveau intra tumoral et au niveau extra-tumoral (grosses artères). Ensuite, il semblerait que l'atteinte artérielle opère à faible exposition traduisant un effet extra tumoral mais une inefficacité au sein de la tumeur. Même à bonne exposition, une atteinte importante des grosses artères s'accompagne d'une progression plus importante. Ces résultats traduisent le caractère urgent de la prise en charge de l'atteinte artérielle dans le suivi thérapeutique pharmacologique chez les patients traités par antiangiogéniques dans le but d'améliorer l'efficacité de ces traitements.

PERSPECTIVES

Dans cette thèse nous avons montré qu'il existait une atteinte précoce des grosses artères sous AAD, traduite par une augmentation de la rigidité artérielle et d'un remodelage externe carotidien. Notre hypothèse de départ est que l'augmentation de pression est en partie due à une atteinte spécifique des AAD sur la paroi des grosses artères au travers d'une ischémie, d'une fibrose et d'une inflammation en réponse à la destruction des vasa-vasorum. Nous n'avons pas pu démontrer cette hypothèse avec les techniques dont nous disposons durant ce travail de recherche, par conséquent la première perspective est d'approfondir l'étude des modifications qui opèrent au sein de la paroi des gros vaisseaux sous AAD.

Nous avons contribué au développement d'un logiciel d'analyse de la déformation radiale de la paroi au cours du cycle cardiaque (chapitre 3.3 des matériel et méthodes) qui à partir des données d'échotracking pourrait déjà nous informer sur les modifications de contractilité qui opèrent au sein de la paroi carotidienne lors du traitement antiangiogénique. L'intérêt de ce logiciel est qu'il permet d'étudier la déformation des différentes enveloppes de la paroi artérielle : intima-média, media-adventice et adventice (segments 1,2 et 3). En se basant sur l'hypothèse que les AAD induisent une destruction des vasa-vasorum, ceux-ci se situant principalement dans la média externe et l'adventice, par conséquent l'ischémie induite entrainera une destruction des cellules musculaires lisses donc moins de déformation de la paroi. Nous nous attendons donc à observer une réduction de la déformation de la paroi principalement dans les segments 2 et 3. Ce logiciel conçu par le département d'ingénierie biomédicale de l'université d'Eindhoven dans le cadre d'une collaboration a été validé in vitro sur des artères artificielles, des carotides de porcs et des carotides humaines provenant d'endartériectomie. Ce logiciel n'a pas encore été validé in-vivo, à cette fin, j'effectue actuellement une étude de reproductibilité de la mesure de l'étirement à partir des données d'échotracking de la carotide de sujets sains, de patients hypertendus et de patients atteints de cancers solides. Une fois que nous aurons établi la précision de la mesure en pratique clinique, nous étudierons les variations de la déformation de la paroi carotidienne au cours du traitement antiangiogénique.

Dans ce travail de recherche nous avons également montré, à partir de modèles statistiques que l'augmentation de la rigidité artérielle observée sous AAD était en partie indépendante de l'augmentation de pression. Nous avons récemment initié un travail en collaboration avec le département d'ingénierie biomédicale de l'université de Maastricht portant sur l'étude des

relations entre les modifications de rigidité carotidienne et de pression artérielle sous traitement AAD basé sur un modèle mono-exponentiel de la relation pression-diamètre à partir des données d'échotracking de la carotide mesurées chez les patients lors de l'étude observationnelle longitudinale. Ce travail nous permettra de confirmer le caractère pression-indépendant de l'atteinte artérielle observée sous AAD. Les résultats préliminaires de cette analyse montrent que l'augmentation de la rigidité carotidienne observée est de 1.2m/s, associée à une augmentation de la pression artérielle diastolique de 15mmHg, alors que selon le modèle mono-exponentiel de la relation pression-diamètre, l'augmentation de rigidité carotidienne attendue était de 0.9m/s. La différence entre la mesure observée et la mesure attendue est significative ($p=0.03$) confirmant ainsi notre modèle statistique en montrant un effet pharmacologique des AAD sur la paroi carotidienne indépendamment des modifications de pression artérielle.

La principale perspective de ce travail de thèse sera la mise en place d'un essai clinique visant à comparer l'efficacité des AAD selon l'ajustement des doses en fonction du suivi thérapeutique pharmacologique et de l'atteinte artérielle ou selon la pratique actuelle. Cet essai est en cours de discussion entre nos partenaires pharmacologues et cancérologues à l'hôpital Cochin et les cancérologues de l'HEGP.

Une troisième perspective serait d'aller plus en profondeur dans le mécanisme physiopathologique par lequel les AAD agissent sur la paroi des grosses artères induisant une augmentation de la rigidité. En effet, il est peu probable que des modifications structurales expliquent une augmentation aussi rapide. La piste des modifications tissulaires semble plus cohérente avec une réorganisation rapide des composants de la matrice extracellulaire probablement due à une destruction des vasa-vasorum au niveau de la média externe et de l'adventice des artères.

Enfin, une étudiante de master 2 de recherche (médecin) qui débutera en octobre 2014, étudiera principalement la VOP et les ondes de réflexion chez 50 sujets chez qui un traitement par antiangiogénique par sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, regorafenid ou bevacizumab avec pour objectif principal de montrer que l'élévation de la VOP au cours de la première semaine de traitement par AAD est prédictive d'une résistance au traitement et pour objectif secondaire de montrer qu'une élévation initiale de l'AIX ($>10\%$ de la norme) est prédictive d'une augmentation de la survie et de la progression sous AAD.

CONCLUSION

Au cours de ce travail de recherche, nous avons observé une atteinte des grosses artères suite à la prise d'AAD. Cette atteinte est précoce, importante et indépendante de l'augmentation de pression induite par ces traitements. Nous avons également montré que les propriétés des grosses artères avant l'initiation du traitement étaient impliquées dans la physiopathologie de l'hypertension induite par les AAD et prédisaient l'augmentation de la pression systolique. Contrairement à certains articles de la littérature nous n'avons pas montré de relation entre l'augmentation de pression et l'efficacité des traitements AAD. En revanche nous avons mis en évidence qu'une augmentation de la rigidité artérielle mesurée au travers de la VOP carotido-fémorale et de la rigidité carotidienne étaient associées à une augmentation du risque de progression tumorale. L'atteinte artérielle observée est le résultat d'un effet pharmacologique des AAD sur la paroi artérielle indépendamment de l'augmentation de pression induite par ces traitements. D'un autre côté nous avons confirmé les données de la littérature montrant que meilleure était l'exposition aux AAD, meilleure était l'efficacité de ces traitements. Nous avons donc en évidence une association positive entre l'atteinte artérielle et la progression tumorale alors qu'il existe une association négative entre les concentrations plasmatiques et la réponse carcinologique. Ces discordances pourraient être expliquées par le fait que l'atteinte artérielle est le reflet d'une action extra-tumorale des AAD, n'étant pas en lien avec l'action de ces traitements au sein de la tumeur. Bien que le mécanisme physiopathologique entre l'atteinte artérielle induite par les AAD et la progression tumorale ne soit pas encore élucidé, des seuils de concentrations plasmatiques des AAD ont été établis pour le sorafenib et le sunitinib à 3.7mg/l et 51.7µg/l respectivement, dans le but de délimiter une fenêtre thérapeutique dans laquelle ces traitements auront une efficacité optimale tout en limitant le risque de toxicités lié à la prise de ces traitements. De tels seuils et les adaptations thérapeutiques qui en découlent doivent être validés avant de servir de référence aux cliniciens pour l'adaptation des doses dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique tout en prenant en compte les toxicités et l'atteinte artérielle.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-1186.
- (2) Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(5):329-337.
- (3) Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-410.
- (4) Livre: Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Groupe de réflexion sur la recherche cardiovasculaire. Edition 2007
- (5) Livre : Cancérologie fondamentale. Société française du cancer. Edition 2005
- (6) Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):449-458.
- (7) Tabata S, Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Katayama K, Yamaguchi A. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor strengthens cell invasion ability via prokineticin receptor 2 in colon cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2013;29(2):459-463.
- (8) Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(10):3967-3979.
- (9) Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res.* 2009;33(5):638-644.
- (10) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994;79(2):315-328.
- (11) Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1(2):149-153.
- (12) Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 1997;390(6658):404-407.

- (13) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88(2):277-285.
- (14) Vuorio T, Jauhiainen S, Yla-Herttuala S. Pro- and anti-angiogenic therapy and atherosclerosis with special emphasis on vascular endothelial growth factors. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(1):79-92.
- (15) Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med*. 2011;32(2):88-111.
- (16) Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(9):507-518.
- (17) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-676.
- (18) Tobelem G. [Physiologic and neoplastic angiogenesis]. *J Chir (Paris)*. 2008;145 Spec No 1:1S4-7.
- (19) Hainaud P, Contreres JO, Villemain A, Liu LX, Plouet J, Tobelem G, Dupuy E. The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res*. 2006;66(17):8501-8510.
- (20) Dupuy E, Hainaud P, Villemain A, Bodevin-Phedre E, Brouland JP, Briand P, Tobelem G. Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model. *J Hepatol*. 2003;38(6):793-802.
- (21) Bonnin P, Villemain A, Vincent F, Debbabi H, Silvestre JS, Contreres JO, Levy BI, Tobelem G, Dupuy E. Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(4):561-570.
- (22) Ravaud A. The mechanism of tumor angiogenesis. *Prog Urol*. 2007;17(1 Suppl 1):144-147.
- (23) Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005;307(5706):58-62.
- (24) Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*. 1997;57(20):4593-4599.

- (25) Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, de Vos AM. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*. 1998;6(9):1153-1167.
- (26) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-2342.
- (27) Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(26):2666-2676.
- (28) Chung EK, Posadas EM, Kasza K, Karrison T, Manchen E, Hahn OM, Stadler WM. A phase II trial of gemcitabine, capecitabine, and bevacizumab in metastatic renal carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2011;34(2):150-154.
- (29) Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(24):2542-2550.
- (30) Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370(9605):2103-2111.
- (31) Gonzalez-Martin A, Gladieff L, Tholander B, Stroyakovsky D, Gore M, Scambia G, Kovalenko N, Oaknin A, Ronco JP, Freuden sprung U, Pignata S. Efficacy and safety results from OCTAVIA, a single-arm phase II study evaluating front-line bevacizumab, carboplatin and weekly paclitaxel for ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49(18):3831-3838.
- (32) Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2039-2045.

- (33) Dossier de soumission du bevacizumab à la FDA. Revue de pharmacologie et toxicologie clinique. www.fda.gov/cder/foi/nda/2004/STN-125085_Avastin_BioPharmr.pdf
- (34) Garnier-Viougeat N, Rixe O, Paintaud G, Ternant D, Degenne D, Mouawad R, Deray G, Izzedine H. Pharmacokinetics of bevacizumab in haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(3):975.
- (35) Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P, Raymond E. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):25-35.
- (36) Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368(9544):1329-1338.
- (37) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):115-124.
- (38) Blumenthal GM, Cortazar P, Zhang JJ, Tang S, Sridhara R, Murgo A, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist*. 2012;17(8):1108-1113.
- (39) Résumé des caractéristiques du sunitinib par l'EMA : http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000687/WC500057737.pdf
- (40) Bello CL, Sherman L, Zhou J, Verkh L, Smeraglia J, Mount J, Klamerus KJ. Effect of food on the pharmacokinetics of sunitinib malate (SU11248), a multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor: results from a phase I study in healthy subjects. *Anticancer Drugs*. 2006;17(3):353-358.
- (41) Sakamoto KM. Su-11248 Sugén. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5(12):1329-1339.

- (42) Bello CL, Garrett M, Sherman L, Smeraglia J, Ryan B, Toh M. Pharmacokinetics of sunitinib malate in subjects with hepatic impairment. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(4):699-707.
- (43) Almhanna K, Philip PA. Safety and efficacy of sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2009;2:261-267.
- (44) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):125-134.
- (45) Résumé des caractéristiques du sorafenib par l'EMA : http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000690/WC50027704.pdf
- (46) Hornecker M, Blanchet B, Billefont B, Sassi H, Ropert S, Taieb F, Mir O, Abbas H, Harcouet L, Coriat R, Dauphin A, Goldwasser F, Tod M. Saturable absorption of sorafenib in patients with solid tumors: a population model. *Invest New Drugs*. 2012;30(5):1991-2000.
- (47) Kennoki T, Kondo T, Kimata N, Murakami J, Ishimori I, Nakazawa H, Hashimoto Y, Kobayashi H, Iizuka J, Takagi T, Yoshida K, Tanabe K. Clinical results and pharmacokinetics of sorafenib in chronic hemodialysis patients with metastatic renal cell carcinoma in a single center. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41(5):647-655.
- (48) Iyer R, Fetterly G, Lugade A, Thanavala Y. Sorafenib: a clinical and pharmacologic review. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;11(11):1943-1955.
- (49) Ravaud A, Bello CL. Exposure-response relationships in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib: maintaining optimum efficacy in clinical practice. *Anticancer Drugs*. 2011;22(5):377-383.
- (50) Fukudo M, Ito T, Mizuno T, Shinsako K, Hatano E, Uemoto S, Kamba T, Yamasaki T, Ogawa O, Seno H, Chiba T, Matsubara K. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(2):185-196.
- (51) Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, Thomas-Schoemann A, Mir O, Taieb F, Durand JP, Coriat R, Dauphin A, Vidal M, Tod M, Lorient MA, Goldwasser F, Blanchet B. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS One*. 2012;7(8):e42875.

- (52) Boudou-Rouquette P, Ropert S, Mir O, Coriat R, Billefont B, Tod M, Cabanes L, Franck N, Blanchet B, Goldwasser F. Variability of sorafenib toxicity and exposure over time: a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Oncologist*. 2012;17(9):1204-1212.
- (53) Common Terminology Criteria for Adverse Events http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf
- (54) Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2013;31(7):1281-1357.
- (55) Halimi JM, Azizi M, Bobrie G, Bouche O, Deray G, des Guetz G, Lecomte T, Levy B, Mourad JJ, Nochy D, Oudard S, Rieu P, Sahali D. Vascular and renal effects of anti-angiogenic therapy. *Nephrol Ther*. 2008;4(7):602-615.
- (56) Gupta R, Maitland ML. Sunitinib, hypertension, and heart failure: a model for kinase inhibitor-mediated cardiotoxicity. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13(6):430-435.
- (57) Martin G, Bellido L, Cruz JJ. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome induced by sunitinib. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3559.
- (58) Choueiri TK, Schutz FA, Je Y, Rosenberg JE, Bellmunt J. Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Clin Oncol*. 2010;28(13):2280-2285.
- (59) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M, Negrier S, Chevreau C, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Anderson S, Hoflana G, Shan M, Pena C, Lathia C, Bukowski RM. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3312-3318.
- (60) Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, Woulfe K, Pravda E, Cassiola F, Desai J, George S, Morgan JA, Harris DM, Ismail NS, Chen JH, Schoen FJ, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Force T, Chen MH.

- Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet*. 2007;370(9604):2011-2019.
- (61) el Khader K, Ziade J, Bansard JY, Mhidia A, Patard JJ, Guille F, Lobel B. Outcome of renal function in 114 patients who underwent uninephrectomy for renal cancer. *Prog Urol*. 1998;8(3):341-346.
- (62) Machado FG, Kuriki PS, Fujihara CK, Fanelli C, Arias SC, Malheiros DM, Camara NO, Zatz R. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model. *PLoS One*. 2012;7(6):e39580.
- (63) Izzedine H, Ederhy S, Goldwasser F, Soria JC, Milano G, Cohen A, Khayat D, Spano JP. Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients. *Ann Oncol*. 2009;20(5):807-815.
- (64) Maitland ML, Kasza KE, Karrison T, Moshier K, Sit L, Black HR, Undevia SD, Stadler WM, Elliott WJ, Ratain MJ. Ambulatory monitoring detects sorafenib-induced blood pressure elevations on the first day of treatment. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6250-6257.
- (65) Steeghs N, Rabelink TJ, op 't Roodt J, Batman E, Cluitmans FH, Weijl NI, de Koning E, Gelderblom H. Reversibility of capillary density after discontinuation of bevacizumab treatment. *Ann Oncol*. 2009;21(5):1100-1105.
- (66) Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2009;48(1):9-17.
- (67) Wu S, Chen JJ, Kudelka A, Lu J, Zhu X. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2008;9(2):117-123.
- (68) Schmidinger M, Zielinski CC, Vogl UM, Bojic A, Bojic M, Schukro C, Ruhsam M, Hejna M, Schmidinger H. Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(32):5204-5212.
- (69) Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2007;25(9):1751-1762.

- (70) Doyle JJ, Neugut AI, Jacobson JS, Grann VR, Hershman DL. Chemotherapy and cardiotoxicity in older breast cancer patients: a population-based study. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8597-8605.
- (71) Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1788-1795.
- (72) Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(5):332-344.
- (73) Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol.* 2008;19(5):927-934.
- (74) Steeghs N, Gelderblom H, Roodt JO, Christensen O, Rajagopalan P, Hovens M, Putter H, Rabelink TJ, de Koning E. Hypertension and rarefaction during treatment with telatinib, a small molecule angiogenesis inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3470-3476.
- (75) Kappers MH, van Esch JH, Sluiter W, Sleijfer S, Danser AH, van den Meiracker AH. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension.* 2010;56(4):675-681.
- (76) Kappers MH, de Beer VJ, Zhou Z, Danser AH, Sleijfer S, Duncker DJ, van den Meiracker AH, Merkus D. Sunitinib-induced systemic vasoconstriction in swine is endothelin mediated and does not involve nitric oxide or oxidative stress. *Hypertension.* 2012;59(1):151-157.
- (77) Maitland ML, Bakris GL, Black HR, Chen HX, Durand JB, Elliott WJ, Ivy SP, Leier CV, Lindenfeld J, Liu G, Remick SC, Steingart R, Tang WH. Initial assessment, surveillance, and management of blood pressure in patients receiving vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(9):596-604.
- (78) Mir O, Coriat R, Ropert S, Cabanes L, Blanchet B, Camps S, Billefont B, Knebelmann B, Goldwasser F. Treatment of bevacizumab-induced hypertension by amlodipine. *Invest New Drugs.* 2012;30(2):702-707.
- (79) Curwen JO, Musgrove HL, Kendrew J, Richmond GH, Ogilvie DJ, Wedge SR. Inhibition of vascular endothelial growth factor- α signaling induces hypertension: examining the effect of cediranib (recentin; AZD2171) treatment on blood pressure in

- rat and the use of concomitant antihypertensive therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):3124-3131.
- (80) Miura S, Fujino M, Matsuo Y, Tanigawa H, Saku K. Nifedipine-induced vascular endothelial growth factor secretion from coronary smooth muscle cells promotes endothelial tube formation via the kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1/NO pathway. *Hypertens Res.* 2005;28(2):147-153.
- (81) Kruzliak P, Kovacova G, Pechanova O. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of angiogenesis-inhibitor-induced hypertension. *Angiogenesis.* 2013;16(2):289-295.
- (82) Dienstmann R, Brana I, Rodon J, Tabernero J. Toxicity as a biomarker of efficacy of molecular targeted therapies: focus on EGFR and VEGF inhibiting anticancer drugs. *Oncologist.* 2011;16(12):1729-1740.
- (83) Hurwitz HI, Douglas PS, Middleton JP, Sledge GW, Johnson DH, Reardon DA, Chen D, Rosen O. Analysis of early hypertension and clinical outcome with bevacizumab: results from seven phase III studies. *Oncologist.* 2013;18(3):273-280.
- (84) Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1172-1183.
- (85) Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(8):626-635.
- (86) Gruenwald V, Beutel G, Schuch-Jantsch S, Reuter C, Ivanyi P, Ganser A, Haubitz M. Circulating endothelial cells are an early predictor in renal cell carcinoma for tumor response to sunitinib. *BMC Cancer.* 2010;10:695.
- (87) Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(7):1027-1034.
- (88) Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis.* 1985;5(1):19-34.
- (89) Clark JM, Glagov S. Structural integration of the arterial wall. I. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest.* 1979;40(5):587-602.
- (90) Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec.* 2000;258(1):1-14.

- (91) Gabella G. Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. *Physiol Rev.* 1984;64(2):455-477.
- (92) Langewouters GJ, Wesseling KH, Goedhard WJ. The static elastic properties of 45 human thoracic and 20 abdominal aortas in vitro and the parameters of a new model. *J Biomech.* 1984;17(6):425-435.
- (93) Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension.* 1995;26(2):355-362.
- (94) Arcaro G, Laurent S, Jondeau G, Hoeks AP, Safar ME. Stiffness of the common carotid artery in treated hypertensive patients. *J Hypertens.* 1991;9(10):947-954.
- (95) Asmar R, Benetos A, London G, Hugue C, Weiss Y, Topouchian J, Laloux B, Safar M. Aortic distensibility in normotensive, untreated and treated hypertensive patients. *Blood Press.* 1995;4(1):48-54.
- (96) Collaboration RVfAS. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J.* 2010;31(19):2338-2350.
- (97) McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1753-1760.
- (98) Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(1):90-97.
- (99) Bussy C, Boutouyrie P, Lacolley P, Challande P, Laurent S. Intrinsic stiffness of the carotid arterial wall material in essential hypertensives. *Hypertension.* 2000;35(5):1049-1054.
- (100) Laurent S, Boutouyrie P, Benetos A. Pathophysiology of hypertension in the elderly. *Am J Geriatr Cardiol.* 2002;11(1):34-39.
- (101) Laurent S, Alivon M, Beaussier H, Boutouyrie P. Aortic stiffness as a tissue biomarker for predicting future cardiovascular events in asymptomatic hypertensive subjects. *Ann Med.* 2012;44 Suppl 1:S93-97.
- (102) Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and

- cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*. 2001;37(5):1236-1241.
- (103) Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*. 2003;34(5):1203-1206.
- (104) Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*. 2002;39(1):10-15.
- (105) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 1999;99(18):2434-2439.
- (106) Meaume S, Rudnichi A, Lynch A, Bussy C, Sebban C, Benetos A, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular disease in subjects over 70 years old. *J Hypertens*. 2001;19(5):871-877.
- (107) Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Knetsch AM, van den Meiracker AH, Schalekamp MA, Hofman A, Witteman JC. Arterial stiffness as the candidate underlying mechanism for postural blood pressure changes and orthostatic hypotension in older adults: the Rotterdam Study. *J Hypertens*. 2006;24(2):339-344.
- (108) Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation*. 2002;106(16):2085-2090.
- (109) Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006;113(5):664-670.
- (110) Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1318-1327.
- (111) Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, Boutouyrie P, Cameron J, Chen CH, Cruickshank JK, Hwang SJ, Lakatta EG, Laurent S, Maldonado J, Mitchell GF, Najjar SS, Newman AB, Ohishi M, Pannier B, Pereira T, Vasani RS, Shokawa T, Sutton-Tyrell K, Verbeke F, Wang KL, Webb DJ, Willum-Hansen T, Zoungas S, McEnery CM, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-

- analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2014
- (112) Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen TW, Wachtell K, Ibsen H, Torp-Pedersen C, Hildebrandt P, Olsen MH. Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE. *Eur Heart J.* 2010;31(7):883-891.
- (113) Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation.* 2001;103(7):987-992.
- (114) Livre : McDonald's blood flow in arteries: theoretical experimental and clinical principles. 6th Edition
- (115) Kelly RP, Millasseau SC, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Vasoactive drugs influence aortic augmentation index independently of pulse-wave velocity in healthy men. *Hypertension.* 2001;37(6):1429-1433.
- (116) Sharman JE, Davies JE, Jenkins C, Marwick TH. Augmentation index, left ventricular contractility, and wave reflection. *Hypertension.* 2009;54(5):1099-1105.
- (117) Janner JH, Godtfredsen NS, Ladelund S, Vestbo J, Prescott E. Aortic augmentation index: reference values in a large unselected population by means of the SphygmoCor device. *Am J Hypertens.* 2010;23(2):180-185.
- (118) London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME. Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension.* 2001;38(3):434-438.
- (119) Manisty C, Mayet J, Tapp RJ, Parker KH, Sever P, Poulter NR, Thom SA, Hughes AD. Wave reflection predicts cardiovascular events in hypertensive individuals independent of blood pressure and other cardiovascular risk factors: an ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial) substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(1):24-30.
- (120) Chirinos JA, Zambrano JP, Chakko S, Veerani A, Schob A, Willens HJ, Perez G, Mendez AJ. Aortic pressure augmentation predicts adverse cardiovascular events in patients with established coronary artery disease. *Hypertension.* 2005;45(5):980-985.
- (121) Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, Agapitos M, Toutouzas P. Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation.* 1995;91(10):2669-2678.

- (122) Veronese ML, Mosenkis A, Flaherty KT, Gallagher M, Stevenson JP, Townsend RR, O'Dwyer PJ. Mechanisms of hypertension associated with BAY 43-9006. *J Clin Oncol*. 2006;24(9):1363-1369.
- (123) Masugata H, Senda S, Himoto T, Okuyama H, Inukai M, Murao K, Hosomi N, Yukiiri K, Kohno M, Yamagami A, Kohno T, Goda F. Early detection of hypertension in a patient treated with sunitinib by measuring cardio-ankle vascular index. *Tohoku J Exp Med*. 2009;218(2):115-119.
- (124) Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-655.
- (125) Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247.
- (126) Boutouyrie P, Bussy C, Lacolley P, Girerd X, Laloux B, Laurent S. Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. *Circulation*. 1999;100(13):1387-1393.
- (127) Kelly R, Hayward C, Avolio A, O'Rourke M. Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. *Circulation*. 1989;80(6):1652-1659.
- (128) Chen CH, Nevo E, Fetis B, Pak PH, Yin FC, Maughan WL, Kass DA. Estimation of central aortic pressure waveform by mathematical transformation of radial tonometry pressure. Validation of generalized transfer function. *Circulation*. 1997;95(7):1827-1836.
- (129) Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension*. 2001;38(4):932-937.
- (130) Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-2605.
- (131) Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FU, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T. Expert consensus document on the measurement of

- aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens.* 2012;30(3):445-448.
- (132) Beaussier H, Masson I, Collin C, Bozec E, Laloux B, Calvet D, Zidi M, Boutouyrie P, Laurent S. Carotid plaque, arterial stiffness gradient, and remodeling in hypertension. *Hypertension.* 2008;52(4):729-736.
- (133) Ong KT, Perdu J, De Backer J, Bozec E, Collignon P, Emmerich J, Fauret AL, Fiessinger JN, Germain DP, Georgesco G, Hulot JS, De Paepe A, Plauchu H, Jeunemaitre X, Laurent S, Boutouyrie P. Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet.* 2010;376(9751):1476-1484.
- (134) Collin C, Briet M, Tran TC, Beaussier H, Benistan K, Bensalah M, Mousseaux E, Froissart M, Bozec E, Laurent S, Boutouyrie P, Germain DP. Long-term changes in arterial structure and function and left ventricular geometry after enzyme replacement therapy in patients affected with Fabry disease. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19(1):43-54.
- (135) Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Zidi M, Agabiti-Rosei E, Laurent S. Multiaxial mechanical characteristics of carotid plaque: analysis by multiarray echotracking system. *Stroke.* 2007;38(1):117-123.
- (136) Meinders JM, Hoeks AP. Simultaneous assessment of diameter and pressure waveforms in the carotid artery. *Ultrasound Med Biol.* 2004;30(2):147-154.
- (137) Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano AI, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension.* 2006;47(3):371-376.
- (138) Boekhoven RW, Lopata RG, van Sambeek MR, van de Vosse FN, Rutten MC. A novel experimental approach for three-dimensional geometry assessment of calcified human stenotic arteries in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2013;39(10):1875-1886.
- (139) Meinders JM, Brands PJ, Willigers JM, Kornet L, Hoeks AP. Assessment of the spatial homogeneity of artery dimension parameters with high frame rate 2-D B-mode. *Ultrasound Med Biol.* 2001;27(6):785-794.
- (140) Chen H, Shi H, Varghese T. Improvement of elastographic displacement estimation using a two-step cross-correlation method. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(1):48-56.
- (141) Lopata RG, Nillesen MM, Hansen HH, Gerrits IH, Thijssen JM, de Korte CL. Performance evaluation of methods for two-dimensional displacement and strain

- estimation using ultrasound radio frequency data. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35(5):796-812.
- (142) Boekhoven RW, Rutten MC, van Sambeek MR, van de Vosse FN, Lopata RG. Echo-computed tomography strain imaging of healthy and diseased carotid specimens. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40(6):1329-1342.
- (143) Harazny JM, Raff U, Welzenbach J, Ott C, Ritt M, Lehmann M, Michelson G, Schmieder RE. New software analyses increase the reliability of measurements of retinal arterioles morphology by scanning laser Doppler flowmetry in humans. *J Hypertens.* 2011;29(4):777-782.
- (144) Izzard AS, Rizzoni D, Agabiti-Rosei E, Heagerty AM. Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage. *J Hypertens.* 2005;23(2):247-250.
- (145) Salvetti M, Agabiti Rosei C, Paini A, Aggiusti C, Cancarini A, Duse S, Semeraro F, Rizzoni D, Agabiti Rosei E, Muiesan ML. Relationship of wall-to-lumen ratio of retinal arterioles with clinic and 24-hour blood pressure. *Hypertension.* 2014;63(5):1110-1115.
- (146) Harazny JM, Ritt M, Baleanu D, Ott C, Heckmann J, Schlaich MP, Michelson G, Schmieder RE. Increased wall:lumen ratio of retinal arterioles in male patients with a history of a cerebrovascular event. *Hypertension.* 2007;50(4):623-629.
- (147) Di Gion P, Kanefendt F, Lindauer A, Scheffler M, Doroshyenko O, Fuhr U, Wolf J, Jaehde U. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(9):551-603.
- (148) Blanchet B, Billefont B, Cramard J, Benichou AS, Chhun S, Harcouet L, Ropert S, Dauphin A, Goldwasser F, Tod M. Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(4):1109-1114.
- (149) Blanchet B, Saboureau C, Benichou AS, Billefont B, Taieb F, Ropert S, Dauphin A, Goldwasser F, Tod M. Development and validation of an HPLC-UV-visible method for sunitinib quantification in human plasma. *Clin Chim Acta.* 2009;404(2):134-139.
- (150) Azizi M, Chedid A, Oudard S. Home blood-pressure monitoring in patients receiving sunitinib. *N Engl J Med.* 2008;358(1):95-97.
- (151) Karovic S, Wen Y, Karrison TG, Bakris GL, Levine MR, House LK, Wu K, Thomeas V, Rudek MA, Wright JJ, Cohen EE, Fleming GF, Ratain MJ, Maitland ML.

- Sorafenib Dose Escalation Is Not Uniformly Associated With Blood Pressure Elevations in Normotensive Patients With Advanced Malignancies. *Clin Pharmacol Ther.* 2014.
- (152) van der Veldt AA, de Boer MP, Boven E, Eringa EC, van den Eertwegh AJ, van Hinsbergh VW, Smulders YM, Serne EH. Reduction in skin microvascular density and changes in vessel morphology in patients treated with sunitinib. *Anticancer Drugs.* 2010 ;21(4):439-446.
- (153) Bamias A, Manios E, Karadimou A, Michas F, Lainakis G, Constantinidis C, Deliveliotis C, Zakopoulos N, Dimopoulos MA. The use of 24-h ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) during the first cycle of sunitinib improves the diagnostic accuracy and management of hypertension in patients with advanced renal cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47(11):1660-1668.
- (154) Osterlund P, Soveri LM, Isoniemi H, Poussa T, Alanko T, Bono P. Hypertension and overall survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing chemotherapy. *Br J Cancer.* 2011;104(4):599-604.
- (155) Arakawa-Todo M, Yoshizawa T, Zennami K, Nishikawa G, Kato Y, Kobayashi I, Kajikawa K, Yamada Y, Matsuura K, Tsukiyama I, Saito H, Hasegawa T, Nakamura K, Sumitomo M. Management of adverse events in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and clinical outcomes. *Anticancer Res.* 2013;33(11):5043-5050.
- (156) Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(8):1698-1711.
- (157) Boutouyrie P, Achouba A, Trunet P, Laurent S. Amlodipine-valsartan combination decreases central systolic blood pressure more effectively than the amlodipine-atenolol combination: the EXPLOR study. *Hypertension.* 2010;55(6):1314-1322.
- (158) Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension.* 2005;45(6):1050-1055.
- (159) Papadopoulou DN, Mendrinos E, Mangioris G, Donati G, Pournaras CJ. Intravitreal ranibizumab may induce retinal arteriolar vasoconstriction in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2009;116(9):1755-1761.
- (160) Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z, Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial

- stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2597-2604.
- (161) Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*. 2014;63(3):520-526.
- (162) Gossel M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(5):H2019-2026.
- (163) Osada H, Kyogoku M, Ishidou M, Morishima M, Nakajima H. Aortic dissection in the outer third of the media: what is the role of the vasa vasorum in the triggering process? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;43(3):e82-88.
- (164) Angouras D, Sokolis DP, Dosios T, Kostomitsopoulos N, Boudoulas H, Skalkas G, Karayannacos PE. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;17(4):468-473.
- (165) Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*. 2013;22(6):399-411.
- (166) Bartsch P, Gibbs JS. Effect of altitude on the heart and the lungs. *Circulation*. 2007;116(19):2191-2202.
- (167) Chen JL, Shang QH, Hu W, Liu C, Mao WH, Liu HQ. Role of TGF-beta1/Smads pathway in carotid artery remodeling in renovascular hypertensive rats and prevention by Enalapril and Amlodipine. *J Geriatr Cardiol*. 2012;9(2):185-191.
- (168) Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens*. 2005;18(1 Pt 2):3S-10S.
- (169) Laurent S, Briet M, Boutouyrie P. Large and small artery cross-talk and recent morbidity-mortality trials in hypertension. *Hypertension*. 2009;54(2):388-392.
- (170) Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2205-2218.
- (171) Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):417-427.
- (172) Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO,

- Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):327-337.
- (173) Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CY, Rajasekeran S, Hagedorn NL, McCarville MB, Stewart CF, Davidoff AM. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(13):3942-3950.
- (174) Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-7109.
- (175) Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med.* 2004;10(2):145-147
- (176) Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Wilding G. Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007;178(5):1883-1887.
- (177) Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(2):357-371.
- (178) Teo YL, Chong XJ, Chue XP, Chau NM, Tan MH, Kanesvaran R, Wee HL, Ho HK, Chan A. Role of sunitinib and SU12662 on dermatological toxicities in metastatic renal cell carcinoma patients: in vitro, in vivo, and outcomes investigation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;73(2):381-388.
- (179) Faivre S, Ronot M, Dreyer C, Serrate C, Hentic O, Bouattour M, Bruno O, Couvelard A, Vilgrain V, Raymond E. Imaging response in neuroendocrine tumors

- treated with targeted therapies: the experience of sunitinib. *Target Oncol.* 2012;7(2):127-133.
- (180) Edeline J, Boucher E, Rolland Y, Vauleon E, Pracht M, Perrin C, Le Roux C, Raoul JL. Comparison of tumor response by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) and modified RECIST in patients treated with sorafenib for hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2012;118(1):147-156.
- (181) Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2010 ;30(1):52-60.
- (182) La Vine DB, Coleman TA, Davis CH, Carbonell CE, Davis WB. Frequent dose interruptions are required for patients receiving oral kinase inhibitor therapy for advanced renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2010;33(3):217-220.
- (183) Lankheet NA, Kloth JS, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Cirkel GA, Mathijssen RH, Lolkema MP, Schellens JH, Voest EE, Sleijfer S, de Jonge MJ, Haanen JB, Beijnen JH, Huitema AD, Steeghs N. Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 2014;110(10):2441-2449.