



Intensification thérapeutique dans les cancers colorectaux par des études pharmacogénétiques et pharmacogénomiques

Olivier Capitain

► **To cite this version:**

Olivier Capitain. Intensification thérapeutique dans les cancers colorectaux par des études pharmacogénétiques et pharmacogénomiques. Médicaments. Université d'Angers, 2010. Français. <tel-00536079>

HAL Id: tel-00536079

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00536079>

Submitted on 15 Nov 2010

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.

**INTENSIFICATION THÉRAPEUTIQUE DANS LES CANCERS
COLORECTAUX PAR DES ÉTUDES
PHARMACOGÉNÉTIQUES ET PHARMACOGÉNOMIQUES**

THÈSE DE DOCTORAT

**Spécialité : Pharmacologie Expérimentale et Clinique
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE et SANTÉ**

Présentée et soutenue publiquement

**le : 9 Mars 2010
à : ANGERS (CRLCC Paul Papin)
par : Olivier CAPITAIN**

Devant le jury ci-dessous :

François-Régis BATAILLE (Président), Professeur, Université d'Angers

Jean-Luc RAOUL (Rapporteur), Professeur, Université de Rennes

Jean-Louis MERLIN (Rapporteur), Professeur, Université de Nancy

Michèle BOISDRON-CELLE (Examineur), PharmD-PhD, CRLCC Paul Papin

Directeur de Thèse:

Erick GAMELIN, Professeur, Université d'Angers

Nom et Coordonnées du Laboratoire :

Laboratoire INSERM U892, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin
2 rue Moll 49933 ANGERS Cedex 9 Tél : 02 41 35 27 00

**INTENSIFICATION THÉRAPEUTIQUE DANS LES CANCERS
COLORECTAUX PAR DES ÉTUDES
PHARMACOGÉNÉTIQUES ET PHARMACOGÉNOMIQUES**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Pharmacologie Expérimentale et Clinique

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE et SANTÉ

Présentée et soutenue publiquement

le : 9 Mars 2010

à : ANGERS (CRLCC Paul Papin)

par : Olivier CAPITAIN

Devant le jury ci-dessous :

François-Régis BATAILLE (Président), Professeur, Université d'Angers

Jean-Luc RAOUL (Rapporteur), Professeur, Université de Rennes

Jean-Louis MERLIN (Rapporteur), Professeur, Université de Nancy

Michèle BOISDRON-CELLE (Examineur), PharmD-PhD, CRLCC Paul Papin

Directeur de Thèse:

Erick GAMELIN, Professeur, Université d'Angers

Nom et Coordonnées du Laboratoire :

Laboratoire INSERM U892, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin
2 rue Moll 49933 ANGERS Cedex 9 Tél : 02 41 35 27 00

COMPOSITION DU JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur François-Régis BATAILLE

DIRECTEUR DE THESE:

Monsieur le Professeur Erick GAMELIN

RAPPORTEURS :

Monsieur le Professeur Jean-Luc RAOUL

Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN

EXAMINATEURS :

Monsieur le Professeur François-Régis BATAILLE

Madame le Docteur Michèle BOISDRON-CELLE

REMERCIEMENTS

à **MONSIEUR LE PROFESSEUR ERICK GAMELIN**

**Professeur de Cancérologie à la Faculté de Médecine d'Angers
Responsable de l'Unité INSERM U892 au CRLCC Paul Papin**

Vous avez accepté de diriger ce travail de recherche et m'avez accueilli au sein du laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre Paul Papin. Vous avez su me guider au cours de mon Internat. J'ai pu apprécier au cours de ces dix dernières années votre rigueur scientifique ainsi que votre gentillesse et votre disponibilité.

En vous remerciant pour l'intérêt et l'attention que vous m'avez accordés de façon constante,

Soyez assuré de toute ma reconnaissance, de mon profond respect et de toute mon amitié.

à **MONSIEUR LE PROFESSEUR FRANCOIS-REGIS BATAILLE**

**Professeur d'Hématologie à la Faculté de Médecine d'Angers
Directeur du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin**

Vous m'avez fait part de votre précieuse expérience dans le domaine universitaire.

J'ai pu apprécié vos qualités humaines et votre disponibilité constante, mais également votre sens de l'humour salvateur. Vous m'avez assuré de votre soutien constant et ce d'emblée, depuis votre arrivée au CRLCC Paul Papin en tant que Directeur.

Soyez assuré de toute ma gratitude.

Dans l'attente de futures collaborations, que je sais déjà très fructueuses.

à **MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-LUC RAOUL**
Professeur de Cancérologie à la Faculté de Médecine de Rennes

Vous me faites l'honneur de siéger au jury de ma Thèse et de juger ce travail.
J'ai pu apprécier lors de plusieurs rencontres en cours de DES, Symposium et Congrès, vos connaissances dans le domaine de la Cancérologie Digestive et votre sens aigu de la Pédagogie. Lors de ces occasions, j'ai également pu apprécier votre gentillesse et votre constante disponibilité.
Soyez assuré ici de tout mon respect.

à **MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-LOUIS MERLIN**
Professeur de Biologie Cellulaire à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Vous me faites l'honneur de siéger au jury de ma Thèse et de juger ce travail.
Lors d'une rencontre récente à l'occasion d'un congrès international, j'ai pu profiter de vos connaissances dans le domaine de la Biologie Cellulaire Oncologique. J'ai également pu apprécié alors votre humour et votre simplicité.
Soyez assuré ici de tout mon respect.

à **MADAME LE DOCTEUR MICHELE BOISDRON-CELLE et**
MONSIEUR LE PROFESSEUR ALAIN MOREL

Vous m'avez accueilli au sein du laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre Paul Papin et du laboratoire INSERM U892, pendant mon cursus de Master 2 et de Thèse.
Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité constantes qui ont été pour moi d'une aide précieuse tout le long de mon travail.
Soyez assurés de ma reconnaissance, de tout mon respect et de mon amitié.

- à **Tous les Médecins du Centre Paul Papin d'oncologie et de radiothérapie** qui m'ont fait bénéficier de toute leur expérience et de leurs conseils. J'ai pu apprécier leur chaleur humaine vis à vis des malades ainsi que leur gentillesse constante.
Soyez assurés de toute ma reconnaissance.
- à **Tous mes co-Internes et Internes d'Oncologie** : Nathalie, Sophie, Sandrine, Lucille, Rhadija, Clothilde, Marie et les autres qui sont passés au Centre tous ces semestres.
- à Luc, Agnès, Laurence, Maud, Sophie pour leur aide précieuse dans la réalisation technique de ce travail, ainsi qu'à Anne-Lise Poirier pour ses compétences dans le domaine des statistiques.
- à **Tous mes Amis d'enfance** avec qui j'ai grandi: Sophie, Edouard, Audrey, Bardya, Jérôme, Laetitia, Cécile, Valérie, Florence, Damien et Damien, Stéphane...
- à **Mes Amis d'Angers**
Benjamin, qui a toujours été présent pour me soutenir. A notre Amitié.
Nina, et son écoute attentive
Et Ronan, Agnès, Marie, Jean, Caroline, Vincent, Maud, Cyril, Séverine, Alain, Emilie, Nadia, Benoit, Marie-Pierre, Damien, Jérôme, Anne-Hélène, Mathieu, Caroline, Laurent, Sylvie, Hugues, Dorothée, Mailin, pour leur Amitié et tous les moments joyeux et festifs que nous avons partagés.
- à **Ma Famille,**
mon frère Pierrick et ma belle-sœur Annette,
mon neveu Fabian et mes nièces Annaëlle et Elyne,
mes parents Nicole et Jean-François, qui ont toujours été à mes côtés et qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et mes études
mon grand-père Henri
Et tous les autres...

PLAN

I. INTRODUCTION	p 11
II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER COLORECTAL METASTATIQUE	p 20
1. Cancer Colorectal et Chimiothérapie	p 21
2. Intérêt de la Pharmacogénétique en Oncologie Médicale	p 36
3. Pharmacologie du 5-Fluorouracile	p 49
4. Pharmacologie de l'Irinotecan	p 62
5. Pharmacologie de l'Oxaliplatine	p 76
III. TRAVAUX PERSONNELS	
A. PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	p 89
B. PATIENTS ET METHODES	p 92
C. PREMIERE PARTIE :	p 109
5-FLUOROURACILE ET CANCER COLORECTAL METASTATIQUE <i>Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité du 5-Fluorouracile dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques</i>	
1. Présentation du travail	p 110
2. Discussion	p 116
3. Publication N°1	p 119
<i>Influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A and Gamelin E. Pharmacogenomics J. 2007; Article on line; Epub ahead of print.</i>	

Abstract N° 1 (# 424) and Poster Presentation (Board # 94) at the 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA). **Récipiendaire d'un Merit Award ASCO 2007.** p 131

D. DEUXIEME PARTIE : p 132

IRINOTECAN ET CANCER COLORECTAL METASTATIQUE

Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité de l'irinotecan dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques

1. Présentation du travail p 133

2. Discussion p 136

3. **Publication N° 2** p 147

Influence of pharmacogenetic polymorphisms on 5-fluorouracil and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer.

Capitain O, Asevoaia A, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Maillart P, Morel A, and Gamelin E. *Pharmacogenomics J.; accepté, sous presse.*

Abstract N°2 (# 429) and Poster Presentation (Board #41) at the 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA). p 174

4. **Abstract N°3 (# 2140)** p 175

Pharmacokinetic and pharmacogenetic approach to improve dose intensity and tolerance of FOLFIRI + Cetuximab in patients with metastatic CRC. **Capitain O**, Metges JP, Adenis A, Raoul JL, Lecomte T, Lam YH, Faroux R, Masliah C, Berger V, Gamelin E.

Poster Presentation at the 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

5. **Abstract N°4 (# 2120)** p 176

Impact of PI3K, BRAF and KRAS mutations on efficacy of intensified FOLFIRI plus cetuximab regimen in advanced colorectal cancer. Linot B, **Capitain O**, Metges JP, Adenis A, Raoul JL, Paintaud G, Poirier AL, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E.

Poster Presentation at the 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

E. TROISIEME PARTIE : p 177

OXALIPLATINE ET CANCER COLORECTAL METASTATIQUE

Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité de l'oxaliplatine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques

1. Présentation du travail p 178

2. Discussion p 185

3. **Publication N° 3** p 193

*A multivariate analysis of pharmacogenetic biomarkers on efficacy and safety of a first line treatment based on pharmacokinetic 5-fluorouracile regimen combined with oxaliplatin (tailored FOLFOX4) in advanced colorectal cancer. Capitain O, Asevoaia A, Poirier AL, Boisdron-Celle M, Morel A Gamelin E. **Soumis à publication.***

4. **Publication N° 4** p 232

*A multivariate analysis of nucleotid excision repair gene polymorphisms in patients with metastatic colorectal cancer and treated with first-line FOLFOX4 chemotherapy. Capitain O, Asevoaia A, Poirier AL, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E. **Soumis à publication.***

5. **Publication N° 5** p 260

*Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity. The involvement of the oxalate outcome pathway. Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne le B, Gilles S, Boisdron-Celle M, Gamelin. **Clin Cancer Research. 2007; 13(21): 6359-6368.***

IV. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION p 270

V. LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS p 283

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p 285

I. INTRODUCTION

1. Le cancer en France : Etat des lieux.

Avec 278 000 nouveaux cas en 2000 contre 160 000 en 1980 en France, l'incidence des cancers est en augmentation constante dans notre pays comme dans la plupart des pays occidentaux.

Cette augmentation conséquente du nombre de cas de cancers dépistés et traités (quasiment donc le double en moins de 20 ans) est liée au vieillissement de la population - avec une espérance de vie désormais estimée à la naissance de presque 90 ans pour les femmes et 80 pour les hommes -, aux facteurs de risques majeurs de la seconde moitié du vingtième siècle que sont le tabagisme et la consommation d'alcool, à divers facteurs de pollution encore incomplètement isolés, à ce que l'on appelle d'un terme général le « déséquilibre nutritionnel » associé à une alimentation industrielle riche en graisses et déficitaires en produits « frais », et enfin à l'exposition à des facteurs de risques professionnels, trop souvent négligés, tel que l'amiante pour ne prendre que l'exemple le plus connu.

Parallèlement se sont développés sous l'impulsion des pouvoirs publics des campagnes de dépistages de masse efficaces et remboursées par l'Assurance Maladie permettant au sein de populations cibles une identification plus précoce de tumeurs encore accessibles à la chirurgie offrant ainsi un réel espoir de guérison : cancers gynécologiques (cancer du col utérin et frottis cervico-vaginaux pendant la période génitale, cancer du sein et mammographies proposées à toute femme de 50 à 74 ans) et cancers colorectaux (Hémocult^o désormais généralisé en 2009 à tout le territoire et pour toute personne dont l'âge est supérieur à 50 ans).

Le poids économique de la maladie cancéreuse sur la Santé Publique et le retentissement humain et affectif sur la vie des malades et de leurs entourages est considérable: 150 000 personnes meurent chaque année en France d'un cancer - ce qui en fait désormais la première cause de mortalité dans notre pays devant les maladies cardio-vasculaires -, 800 000 personnes vivent avec un cancer et près de 2 millions ont eu un cancer (nombres qui ne font qu'augmenter du fait de la survie constamment prolongée grâce aux progrès médicaux). Finalement le coût global du cancer pour notre système de santé peut être estimé à près de 15 milliards d'euros en 2002 justifiant de récentes mesures de priorité nationale, proposées et inscrites dans les deux « Plans Cancer ». Ces mesures visent à améliorer l'organisation des soins pour tous les malades cancéreux et notamment l'accès aux moyens diagnostiques et technologiques, à augmenter les budgets alloués à la recherche clinique comme fondamentale, à privilégier le bien-être des patients et de leurs familles, et à favoriser les dépistages comme

la prévention en renforçant les soins primaires tout en diminuant les disparités au sein du territoire. Il existe donc (enfin) en France, et depuis moins d'une décennie, une réelle prise de conscience tant de la part des Pouvoirs Publics que des différents professionnels impliqués dans la recherche et les traitements, et ce désormais, en partenariat avec les associations de malades. Ainsi le budget global de soins destiné à la lutte contre le cancer a été considérablement augmenté : plus de 500% en 10 ans.

Avec ces efforts budgétaires et de l'ensemble des partenaires de santé, la prise en charge n'a cessé de s'améliorer et on estime à l'heure actuelle qu'en France 50% de l'ensemble des cancers sont guéris par les moyens thérapeutiques conventionnels mis en œuvre, combinant principalement la chirurgie, la radiothérapie et enfin la chimiothérapie. Concernant cette dernière, elle reste le traitement privilégié des situations malheureusement plus graves, cancers localement évolués et/ou métastatiques, en permettant un allongement certain de la survie des malades, associé le plus souvent à une amélioration de leur qualité de vie, mais n'offrant malheureusement toujours pas d'espoir de curabilité dans la majeure partie des cas. Avec les progrès scientifiques, les nouveaux traitements dits « ciblés », et la place importante enfin reconnue aux soins de support (prise en charge sociale, psychologique, de la douleur, de la nutrition,...), ces situations métastatiques tendent néanmoins à se « chroniciser ».

2. Chimiothérapies « classiques », « ciblées » et Cancers.

L'intérêt en terme de survie des traitements de chimiothérapie cytotoxiques « classiques » doit cependant être constamment contre-balancé tout au long de « l'histoire de la maladie » par les effets secondaires qui découlent de leurs emplois : ces complications, parfois graves voire mortelles, sont liées aux faibles index thérapeutiques de tels médicaments rendant parfois difficiles leurs maniements surtout dans une population de malades déjà affaiblis par la maladie et présentant fréquemment des défaillances d'organes. Le caractère « indistinctif » de ce type de traitements cytolytiques tant sur les cellules cancéreuses (effet bénéfique recherché) que sur tout tissu normal en division rapide (effets délétères responsables des principaux effets secondaires), et les phénomènes de résistance observés tout au long des lignes délivrées, ont amené à privilégier le développement de nouveaux agents thérapeutiques davantage « ciblés » sur la cellule cancéreuse offrant ainsi l'espoir de limiter au maximum les effets délétères sur le reste de l'organisme « sain » tout en optimisant le contrôle de la maladie. Ceci n'a été rendu possible que par les avancées parallèles réalisées ces dernières années en

recherche fondamentale puis appliquée, qui ont permis de décortiquer les principaux mécanismes intimes sous-tendant le développement tumoral tant au niveau de la cellule elle-même (voies de transduction des signaux stimulant *in fine* le cycle cellulaire), qu'au niveau de son environnement (néoangiogenèse activant l'expansion tumorale et facilitant l'évolution métastatique, collagénases tumorales permettant la pénétration et l'implantation de la tumeur, etc...). Après la démonstration de la preuve du concept *in vitro* puis *in vivo* chez l'animal dans les années 90, le début des années 2000 a couronné l'intérêt de ces traitements ciblés avec des résultats parfois tout à fait spectaculaires et jamais atteints par les chimiothérapies usuelles (par exemple l'imatinib (Glivec©) dirigé contre c-kit (CD117) dans les tumeurs stromales digestives et dans la leucémie myéloïde chronique, ou le trastuzumab (Herceptin©) dans les cancers du sein surexprimant le récepteur de surface HER-2). Depuis, les grandes firmes de l'industrie pharmaceutique privilégient de façon très nette le développement de ces nouvelles molécules au détriment des cytotoxiques « classiques » : à l'heure actuelle plusieurs centaines de thérapies ciblées (anticorps ou petites molécules inhibitrices) sont testées dans des essais cliniques de phase I à III à travers le monde, contre moins d'une dizaine de molécules visant la réplication de l'ADN proprement dite!

Ces innovations sont certes souvent encourageantes mais hélas pas toujours proportionnelles au prix des molécules elles-mêmes, et font que, ajouté aux coûts déjà relativement élevés des produits de chimiothérapies conventionnelles, mais également à celui en augmentation croissante des traitements de support (antiémétiques, facteurs de croissance hématopoïétiques,...), le poste « cancer » représente désormais jusqu'à la moitié des dépenses hospitalières de médicaments. Enfin l'expérience clinique et les plus récentes données scientifiques révèlent d'une part que ces nouvelles thérapies ne sont dans leur grande majorité « que » des agents cytostatiques quand elles sont utilisées en monothérapie, au moins en Oncologie, et d'autre part qu'elles n'échappent malheureusement pas aux mécanismes de résistances habituellement observés avec les autres traitements anticancéreux.

Ces mécanismes de résistance, notamment pour les petites molécules inhibitrices, comportent des phénomènes classiques d'adaptation cellulaire aux xénobiotiques - via principalement les pompes à efflux appartenant à la superfamille des protéines de résistance à de multiples drogues (MDR), mais il existe également des phénomènes plus subtils impliquant des protéines kinases (entre autres) constitutionnellement activées et en aval de la cible inhibée par la thérapie, rendant cette dernière donc partiellement voire totalement inefficace (exemple

de la protéine KRas et des anticorps monoclonaux anti HER1 que sont le cetuximab (Erbitux©) et le panitumumab (Vectibix©)). Enfin il apparaît désormais clair que les traitements dits « ciblés » sont d'autant plus efficaces qu'ils visent la voie principale dominante d'activation transductionnelle, - « Driver way » -, du clone tumoral, et non des voies accessoires secondaires, tout en considérant bien sûr qu'il existe de nombreuses interactions entre ces mêmes voies et par conséquent des risques d'échappement thérapeutique.

Toute la difficulté des travaux de recherches fondamentaux et translationnels à l'heure actuelle, est donc d'isoler cette voie principale, généralement très précocément activée dans la carcinogénèse, pour mieux la cibler tout en prévenant de possibles activations en aval. Le schéma caricatural de la simple inhibition d'une voie de transduction aboutissant à l'interruption de la croissance tumorale apparaît donc plus complexe dans les faits, expliquant sans doute l'échec d'essais cliniques pourtant construits sur des raisonnements théoriques prometteurs.

3. Notion d'individualisation des traitements anticancéreux. Rationel de notre Thèse d'Université.

Finalemment au vu des différentes observations rapportées plus haut et de l'expérience clinique, il ressort que :

- Le nombre de patients atteints de cancers va aller **crescendo** dans les décennies à venir
- Les meilleures chances de guérison des cancers solides sont offertes par le **dépistage précoce** de tumeurs non métastatiques encore accessibles à la chirurgie, seul traitement curateur, possiblement associée à des traitements adjuvants incluant la radiothérapie et la chimiothérapie
- L'efficacité des chimiothérapie augmente généralement avec leurs posologies (mais avec le plus souvent un « effet seuil » (**Figure 8, p 40**)), suivant les lois de la croissance tumorale « Gompertzienne » en Oncologie solide décrites il y a plus de 50 ans ; cette augmentation posologique se heurte cependant inévitablement à une élévation majeure et intolérable des taux de toxicité

- Pour un même régime de traitement et dans la même situation clinique, la simple observation nous indique que des patients répondent extraordinairement alors que d'autres très peu voire pas du tout
- Pour une même posologie de chimiothérapie, certains développent des effets secondaires majeurs quand ces derniers peuvent être tout à fait minimes pour d'autres
- Les traitements d'un patient « tout-venant », sont administrés à l'heure actuelle sur des bases probabilistes de réponses (données de la littérature), issues d'études cliniques dont les critères d'inclusion sont souvent stricts (patients sélectionnés) et peu en rapport avec les situations vécues au quotidien pour le praticien ; les taux de toxicités sont par ailleurs souvent minorés ou insuffisamment détaillés dans ces mêmes études cliniques
- L'intérêt d'une chimiothérapie devrait dans l'idéal pouvoir être définie en pré-thérapeutique par le bénéfice net entre l'efficacité prévisible et les effets secondaires attendus, non sur des bases statistiques et observationnelles se rapportant à des données de cohortes, mais bien sur le cas individuel du malade lui-même : prédire les populations de patients à risque d'échec de traitement et/ou à haut risque de toxicité est l'objectif principal désormais recherché en Oncologie Médicale. **Dans ce cadre, la pharmacogénétique peut être d'une aide précieuse, nous y reviendrons.**
- Un faible effort est consacré à l'heure actuelle de la part des grandes firmes pharmaceutiques au développement de nouvelles molécules cytotoxiques de chimiothérapie « classique » c'est à dire visant la réplication de l'ADN proprement dite. Il s'agit donc d'**exploiter au maximum le potentiel des molécules déjà disponibles** pour finalement « faire mieux avec ce que l'on a »
- Un effort par contre conséquent de ces mêmes industriels est consacré à la recherche de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires tumorales dont l'inhibition peut aboutir à des résultats cliniques impressionnants, constituant pour certaines de ces molécules une avancée réelle et majeure dans l'arsenal thérapeutique. Malheureusement ces traitements sont coûteux et également sujets à des phénomènes de résistances intrinsèques. A part dans de rares cas, **ils ne supplantent pas les traitements « classiques » et ne font qu'optimiser l'efficacité de ceux-ci, rendant d'autant plus évidente la**

nécessité des recherches dans le sens de cette optimisation, ce qui est l'objet même de la pharmacogénétique

- Les traitements anticancéreux, comme leurs complications, constituent un coût de santé publique qui impose une rationalisation de leurs utilisations pour que le modèle français du « **meilleur soin pour tous et sans discrimination** » puisse survivre à la pression économique

En considérant ces différentes observations, a émergé ces dernières années la notion de traitement non pas « ciblé » mais « **individualisé** » (ASCO 2009), cherchant à optimiser les schémas de traitements pour définir la meilleure stratégie (doses, fréquences des prises, adaptation) en fonction du patient considéré et des caractéristiques tumorales observées.

- **Concernant les cytotoxiques « classiques »**, il s'agit d'améliorer *l'index thérapeutique*, permettant ainsi d'augmenter leur efficacité tout en limitant les effets secondaires grevant possiblement la qualité de vie du malade et pouvant être potentiellement mortels. L'index thérapeutique d'un médicament est défini en pharmacologie comme le rapport de la dose létale 50 % (dose pour laquelle il est attendu que 50% de sujets décèdent) à la dose efficace (dose pour laquelle le traitement est efficace pour 50% de la population). Plus ce rapport est élevé, meilleur est l'index thérapeutique. En pratique clinique et par extension, ce concept a été adapté et représente, pour une dose donnée le rapport de l'efficacité d'un médicament (effet sur la tumeur) à la tolérance de ce médicament (effets sur les tissus sains) (**voir Figure 8 p 40**). Cette amélioration de l'index thérapeutique passe par la prise en compte des caractéristiques génétiques intrinsèques du métabolisme du patient lui-même (pharmacogénétique), des caractéristiques du métabolisme tumoral avec ses mécanismes potentiels de résistance (pharmacogénomique), et de l'optimisation des doses efficaces par l'étude du devenir du médicament (clairance) dans l'organisme de chaque malade (pharmacocinétique). Finalement l'optimisation de cet index doit permettre le maintien de la dose intensité, (définie par *Hyrniuk et al.* comme la quantité de médicament administrée par unité de temps (mg/m²/semaine), fonction de la dose administrée et de sa fréquence), car c'est cette dose intensité qui est à la base de

l'efficacité de la chimiothérapie. Une meilleure compréhension des mécanismes pharmacologiques et pharmacogénétiques pour chacun des cytotoxiques utilisés, est donc indispensable pour permettre d'atteindre de façon rapide cette dose intensité individualisée.

- **Concernant les nouvelles molécules « ciblées »**, il s'agit d'identifier la voie dominante de transduction impliquée dans le développement du clone tumoral en prenant en considération de possibles mutations activatrices – éventuels facteurs de résistance -, et ainsi viser de façon optimale le niveau moléculaire le plus pertinent en vue de l'obtention de la meilleure réponse thérapeutique. Il apparaît par ailleurs évident qu'il existe également des variabilités de réponses interindividuelles fonction de polymorphismes génétiques constitutionnels : les polymorphismes pour les récepteurs IgG Fc γ et les réponses aux anticorps monoclonaux induisant des réponses de type ADCC (Antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity) en sont un exemple parmi d'autres. La pharmacogénétique a ainsi toute sa place dans le développement et l'optimisation de ces nouvelles classes thérapeutiques.

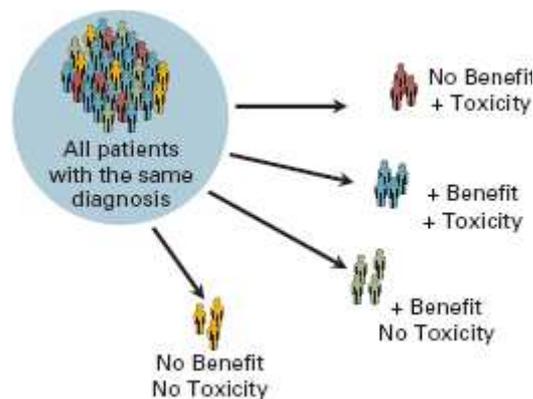


Figure 1. Variabilité de réponses au traitement dans une population

En conclusion, la connaissance du meilleur schéma de dose intensité pour chaque type tumoral et pour chaque individu, l'adaptation des posologies aux métabolismes du patient et de la tumeur, l'exploitation maximale des anciennes molécules probablement sous-exploitées et le ciblage couplé de la voie activatrice dominante, si elle existe, pourrait permettre à l'avenir de définir un protocole « à la carte », associé à des posologies adaptées, optimisant ainsi la réponse tout en limitant au maximum les effets secondaires délétères inhérents aux traitements. L'intérêt d'une telle approche devrait être de pouvoir isoler *avant* le début du traitement, les malades qui ne tireront aucun bénéfice de ce dernier sur leur maladie (toxicités et coût inutiles plus perte de chance sur la survie), et ceux qui développeront des toxicités inacceptables (**Figure 1**). Finalement cette utilisation optimale des traitements anticancéreux devrait logiquement aboutir *in fine* à des économies en termes de coût pour l'Assurance Maladie.

Dans ce cadre général, **la pharmacogénétique et la pharmacogénomique** représentent des voies majeures de recherche et de développement dont les concepts se sont très largement répandus ces dix dernières années, bien qu'encore trop souvent confidentiels, et **qui sont la base du rationnel du travail de Thèse d'Université développé dans ces pages.**

Ce travail a été rendu possible par l'accueil qui nous a été fait dans l'Unité de Recherche INSERM U892, dirigée par monsieur le Professeur Erick GAMELIN, unité reconnue sur le plan international dans ce domaine de recherche, et avec l'aide constante et amicale de Monsieur le Professeur Alain MOREL et Madame le Docteur Michèle BOISDRON-CELLE. Nous développerons dans les pages suivantes nos travaux afin de donner des exemples concrets de l'apport d'une telle approche dans le domaine de prédilection de notre laboratoire, les cancers colorectaux.

**II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA
PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX
CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE**

**II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA
PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX
CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE**

1. CANCER COLORECTAL ET CHIMIOOTHERAPIE

1. Les cancers colorectaux : Carcinogenèse, épidémiologie.

Les cancers colo-rectaux constituent un problème majeur de santé publique dans les pays occidentaux. En Europe, 360 000 nouveaux cas annuels sont diagnostiqués, dont 38 000 en France, ce qui fait du cancer colorectal le premier cancer digestif en incidence. A eux seuls, les cancers colorectaux représentent 15% de la totalité des cancers, juste après le cancer du sein chez la femme, et les cancers du poumon et de prostate chez l'homme. Malgré les progrès accomplis ces dernières années sur le plan thérapeutique tant en terme de chimiothérapie, que par l'avènement et le développement de nouvelles techniques de chirurgie hépatique et pulmonaire, couplées à celles de la radiologie interventionnelle (radiofréquence), ce type de cancer reste une maladie grave : la moitié des patients a d'emblée au diagnostic, ou développera au cours de l'histoire naturelle de la maladie, des métastases qui restent corrélées à un pronostic extrêmement péjoratif : dans ce cas de maladie évoluée, 10% seulement des patients sont vivants à 5 ans (16 000 décès par an).

La fréquence, la gravité au stade métastatique du cancer colorectal - la survie dépend de la précocité du diagnostic -, justifient des efforts réalisés sur le plan national en terme de dépistage via la réalisation d'un test simple, l'hémocult°, consistant en la recherche, dans un échantillon de selles, d'hématies traduisant l'existence d'un saignement chronique occulte - maître symptôme - possiblement en rapport avec des lésions précancéreuses (adénomes = foyer circonscrit de dysplasie) ou cancéreuses (adénocarcinomes), et imposant donc la réalisation d'une colonoscopie d'exploration. Ce test est depuis 18 mois maintenant généralisé à l'ensemble du territoire, et cible la population à risque considéré comme « moyen », au vu de la courbe d'incidence du cancer colorectal (**Figure 2**): population de plus de 50 ans, indifféremment du sexe.

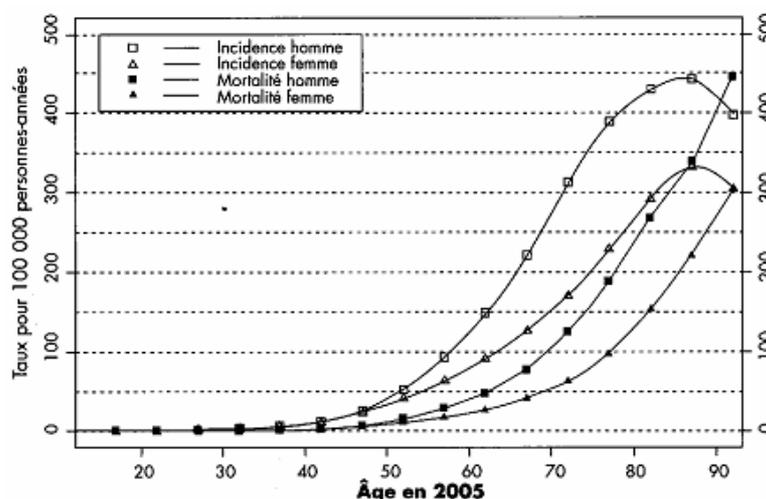


Figure 2. Incidence et Mortalité par Age en 2005.

Le cancer colorectal est en effet avant tout une maladie du vieillissement (la moyenne d'âge au diagnostic est d'environ 70 ans) liée à l'accumulation sur une période allant de 15 à 20 ans d'altérations génomiques et cellulaires (**Figure 3**) au sein de cellules du revêtement muco-épithélial de la paroi digestive, se traduisant parallèlement sur plan anatomopathologique par, et de façon chronologique, l'apparition initiale d'une hyperplasie, évoluant vers une dysplasie de grade variable (l'adénome ou « polype ») et enfin le cancer proprement dit (adénocarcinome lieberkuhnien dans 95% des cas), considéré comme invasif une fois la membrane basale sous-épithéliale franchie : à ce stade, le risque de dissémination métastatique lymphatique et/ou veineuse est majeur (de 30 à 60%), transformant le pronostic de la maladie.

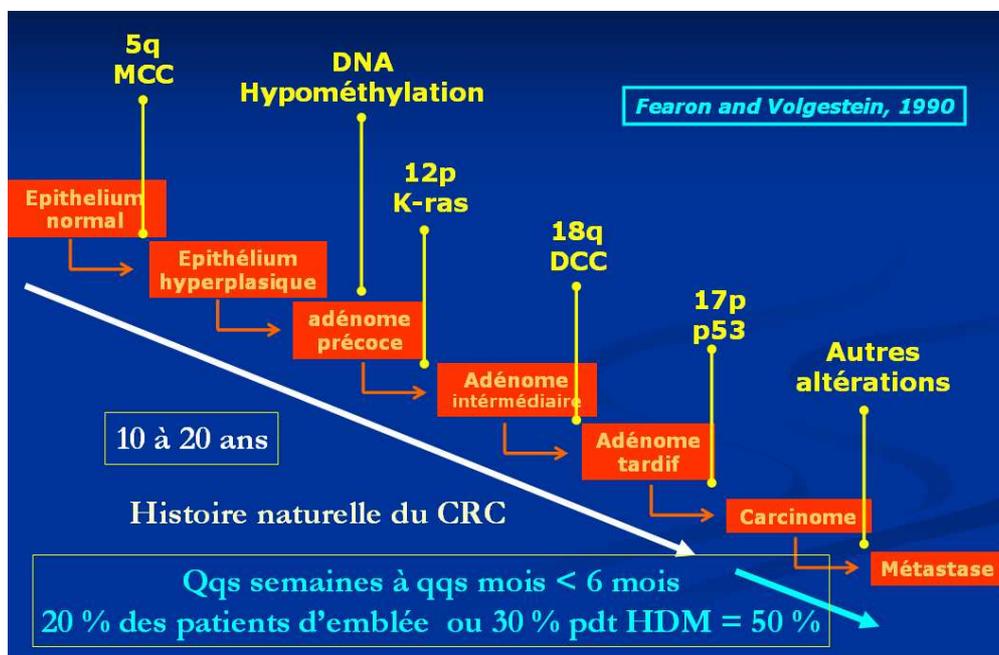


Figure 3. Séquentiel Altérations Génomiques et Histologie.

Les anomalies génétiques correspondent sur le plan du cycle cellulaire en l'activation d'oncogènes (*Kras* par exemple,...) et en l'inactivation d'anti-oncogènes (*APC*, *p53*,....).

Le risque évolutif d'une lésion précancéreuse (adénome) vers un authentique adénocarcinome est d'autant plus grand que le nombre de polypes est élevé, que le type « vilieux » est le type histologique architectural prédominant, que la taille est supérieure à 1 cm, et enfin que le degré de dysplasie est élevé.

La grande majorité des cancers colorectaux sont des cas sporadiques, même si le risque augmente avec l'existence d'antécédents familiaux au premier degré (risque alors considéré

comme « élevé »). Seuls 5% des cancers colorectaux sont reconnus comme strictement liés à des facteurs génétiques, héréditaires, avec transmission autosomique dominante, à forte pénétrance (plus de 90% des sujets atteints d'une mutation constitutionnelle présentent un cancer colorectal), et à expressivité variable (risque « très élevé »): il s'agit de la *Polypose Adénomateuse Familiale (PAF)*, liée à des mutations au niveau de l'antioncogène APC (*Adenomatous polyposis coli*), et le *syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer)*, anciennement nommé *syndrome de Lynch*, lié à des mutations au niveau de gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (MSH2, MLH1, PMS1 et PMS2), se traduisant par un phénotype d'instabilité microsatellite (MSI) dit « RER + » (Replication Error).

La responsabilité de l'environnement dans le développement des cancers colorectaux est maintenant un fait établi. Les données varient d'un pays à l'autre, mais les études épidémiologiques descriptives et les études chez l'animal, suggèrent que, parmi les facteurs d'environnement, l'alimentation et la sédentarité jouent un rôle prépondérant, en plus de l'influence des facteurs génétiques. Les légumes semblent jouer un rôle protecteur dans les dernières phases de la carcinogenèse tandis que les céréales raffinées, les graisses ajoutées, les charcuteries et les abats apparaissent comme des facteurs de risque tout au long de la séquence adénome-cancer. Ainsi un apport calorique élevé et une vie sédentaire sont des éléments synergiques dans cette séquence, probablement par un hyperinsulinisme avec augmentation de l'IGF (insulin growth factor).

2. Les cancers colorectaux : traitements et chimiothérapies.

2.1. Le traitement chirurgical est le seul traitement radical du cancer colorectal, et nécessite un « contrôle-qualité » strict à savoir la confirmation histologique de marges saines minimales de 5 cm de part et d'autre de la tumeur lorsque le siège est dans la partie colique, l'exérèse du mésocolon et des ganglions de drainage (au moins 12 sur l'analyse anatomopathologique), et l'exérèse indispensable du mésorectum dans le cas d'une tumeur rectale. La chirurgie hépatique réglée des métastases est possible dans le même temps opératoire ou dans un second temps, éventuellement couplée dans ce cas à des techniques de radiologie interventionnelle par radiofréquence peropératoire, après chimiothérapie « d'épreuve » de première ligne métastatique. De même la tumeur peut être dans un premier temps laissée en

place si absence d'hémorragie digestive massive mettant en jeu le pronostic vital du patient, et si absence de risque d'occlusion intestinale, sachant que dans ce cas la mise en place d'endoprothèse digestive par voie endoscopique peut être une solution palliative permettant de réaliser un traitement systémique et d'évaluer ainsi la chimiosensibilité du primitif et des métastases avant éventuelle reprise chirurgicale visant une résection complète (R0 = aucune tumeur macroscopiquement résiduelle) de l'ensemble des cibles.

2.2. La chimiothérapie, longtemps utilisée *exclusivement* en situation palliative, a désormais démontrée son utilité

- d'une part dans la prévention des récurrences locales et à distance notamment en cas d'atteintes ganglionnaires sur la pièce d'exérèse (stade III), situation dite « adjuvante »,
- mais également dans les cas de dissémination métastatique localisée (hépatique par exemple) offrant un objectif de potentielle résecabilité secondaire, seul espoir de guérison pour le patient.

A. Monochimiothérapie par 5-Fluorouracile.

En considérant que les 25% des patients ayant des métastases d'emblée et les 30% qui, malgré l'administration de chimiothérapie adjuvante après résection à but curatif, récidiveront, on peut estimer que près de la moitié des 38 000 patients annuellement diagnostiqués porteurs d'un cancer colorectal ont ou auront besoin d'une chimiothérapie à un stade localement avancé ou métastatique.

Jusqu'au début des années 90 - il y a seulement 20 ans -, le standard thérapeutique en situation métastatique était la mise en place de soins de confort avec une espérance de vie qui n'excédait pas les 6 à 8 mois. A l'époque, proposer une chimiothérapie à des patients au pronostic si sombre (généralement des monochimiothérapies) pouvait paraître pour de l'acharnement thérapeutique. Deux études randomisées ont néanmoins permis de démontrer la légitimité d'une telle démarche qui, loin d'être agressive, ne se fait pas au détriment de la qualité de vie des malades, tout à fait respectée par la chimiothérapie. La première étude a inclus 40 patients traités par chimiothérapie de type 5-FU-Acide folinique-Cisplatine versus soins de confort. La médiane de vie a été doublée par le traitement, 11 mois versus 5 mois [1]. La seconde étude a inclus 183 malades, qui ont reçu une chimiothérapie associant 5-FU et méthotrexate soit d'emblée soit secondairement en cas d'apparition de symptômes. La survie globale a été améliorée de 5 mois dans le groupe traité par chimiothérapie d'emblée et la survie sans symptôme a été améliorée de 8 mois [2].

Entre 1990 et 1995, le seul produit de chimiothérapie un peu actif dans le cancer colorectal était le 5-Fluorouracile, et les tentatives de polychimiothérapie associant le méthyl CCNU ou le BCNU s'étaient soldés par des échecs. Le principal travail des équipes a donc été d'optimiser les chimiothérapies à base de 5-FU.

Les premières tentatives positives d'optimisation ont comporté des modulations d'activité du 5-FU par l'acide folinique ou le méthotrexate. De nombreux essais comparant de tels schémas ont été réalisés et publiés mais avec des résultats finalement non conclusifs car souvent basés sur de faibles effectifs. Deux méta-analyses ont permis de trancher : l'adjonction de l'acide folinique (à faible comme à forte dose) avant l'administration de 5-FU permet de doubler le taux de réponse (de 10 à 23%) sans effet sur la survie globale, malgré une bonne puissance statistique (1281 malades) [3]. L'adjonction à forte ou faible dose de méthotrexate a donné des résultats similaires en termes de réponses (10 versus 24%) avec un effet se traduisant cette fois sur la survie globale : 9,1 mois avec 5-FU seul versus 10,7 mois avec la combinaison [4]. Une autre méthode consista à changer la technique d'administration et d'utiliser des perfusions continues plutôt que des bolus ou des perfusions courtes. Une méta-analyse reprenant les huit principaux essais testant divers types de perfusions continues (de quelques jours à plusieurs mois) a montré que la perfusion continue faisait passer le pourcentage de réponses de 14 à 22% ($p=0,0002$), la survie médiane n'étant que très modestement améliorée puisqu'elle passait de 11,3 mois à 12,1 mois ($p=0,04$) [5]. Cette différence minime ne fut pas suffisamment convaincante pour justifier de l'adoption d'un traitement par 5-FU continu pendant tout son traitement, de surcroît beaucoup plus contraignant pour le patient.

Le premier schéma européen intensifié ayant prouvé sa supériorité par rapport au schéma nord américain classique (Mayo-Clinic) de 5-FU + acide folinique est le schéma dit LV5FU2 qui associe à de fortes doses d'acide folinique, un bolus de 5-FU et une perfusion continue de 5-FU, et ce pendant 48h toutes les deux semaines. Après des résultats favorables en phase II, il a été démontré dans un essai français intergroupe incluant 448 patients que le schéma LV5FU2 était supérieur au schéma hebdomadaire bolus en termes de réponses objectives (33% versus 14%, $p=0,0004$) et de survie sans progression 28 semaines versus 22 ($p=0,012$). La survie globale n'était pas statistiquement supérieure dans le bras traité par LV5FU2, mais il existait une tendance favorable (62 versus 57, $p=0,07$) [6].

D'autres types d'optimisation ont également été développés :

- ✓ *La chronochimiothérapie* : Elle respecte les variations nyctémérales d'activité des enzymes métabolisant le 5-FU. Les procédures sont cependant lourdes en terme de gestion des hospitalisations, ce d'autant qu'un essai randomisé comparant le bras 5-FU/acide folinique chronomodulés à un bras identique avec oxaliplatine, n'a retrouvé qu'un taux de réponse décevant (16%) concernant le traitement sans oxaliplatine [7].
- ✓ *L'adaptation pharmacocinétique de doses* : Cette solution développée dans notre centre par Gamelin E. *et al*, a démontré son intérêt en permettant d'obtenir des taux de réponses deux fois plus élevé qu'avec un schéma non adapté (35 versus 18%, $p=0,004$), une meilleure survie médiane (16 versus 13 mois, $p=NS$), et ce sans augmentation des effets secondaires [8].

Tous les protocoles de chimiothérapie développés dans notre travail de Thèse et utilisant le 5-FU bénéficieront de cet apport d'optimisation, permettant des études de pharmacogénétique sans biais liés à des posologies possiblement inadaptées au métabolisme du patient.

B. Nouvelles molécules et Polychimiothérapies à base de 5-Fluorouracile.

1. L'irinotecan (Campto®).

Les premières études rapportant l'intérêt de l'irinotecan dans le cancer colorectal ont été rapportées au Japon et aux Etats-Unis, en monochimiothérapie et sur un schéma hebdomadaire dans le milieu des années 90. En France, une étude de phase II de Rougier *et al*. a rapporté sur 48 patients non prétraités en situation métastatique, des taux de réponse objective de 19% [9]. Ultérieurement, il a été développé des protocoles d'association de ce médicament avec le LV5FU2 [10], ainsi qu'en association avec le schéma hebdomadaire de 5-FU et d'acide folinique à l'allemande [11]. Les pourcentages de réponse approchaient 35% dans le bras des schémas combinés versus bras sans irinotecan : 35% versus 22% ($p<0,005$). Le temps jusqu'à progression ainsi que la survie globale était également notablement augmentés (6,7 versus 4,7 et 17,4 versus 14,1 mois, $p=0,03$).

Des résultats similaires ont été obtenus aux Etats-Unis avec des schémas 5-FU bolus, sans détérioration de la qualité de vie, justifiant le positionnement de l'irinotecan comme un nouveau standard de traitement en monothérapie, comme en association avec le 5-FU (Protocole FOLFIRI pour le plus utilisé en France).

Le principal effet secondaire clinique observé avec l'irinotecan, outre un syndrome cholinergique au moment de sa perfusion et prévenu par l'administration préalable d'atropine 0,25 mg S/C, est un syndrome diarrhéique, possiblement cholériforme et dose dépendante, d'apparition semi retardée (vers le 8^e jour) mais dont l'intensité peut être limitée par l'utilisation adéquate d'antidiarrhéiques type loperamide à posologies adéquates (1 gélule toutes les 2 heures tant que les symptômes persistent). Cette toxicité clinique, ainsi que la toxicité hématologique – neutropénie essentiellement – a imposé la dose de 180 mg/m² d'irinotecan tous les 15 jours en association avec le LV5FU2 afin de limiter, dans une population « tout-venant » de patients, les taux de risques de toxicités sévères (grade 3 ou 4 OMS) à moins de 20%.

2. L'oxaliplatine (Eloxatine^o).

L'oxaliplatine a, contrairement au cisplatine, une activité propre contre les cellules tumorales dérivées de cancers du colon. Alors qu'initialement ce médicament a été utilisé d'emblée combiné au 5-FU + acide folinique, il a fallu attendre 1997, pour qu'un essai de phase II, multicentrique, en première ligne, rapporte 24% de réponse objective en monochimiothérapie, chez 37 patients [12]. Ceci dit, l'intérêt principal de l'oxaliplatine est bien la potentialisation des chimiothérapies par 5-FU et acide folinique via un effet synergique avec le fluorouracile.

Deux essais ont confirmé sur le plan clinique cette synergie, suspectée par les études *in vitro* et précliniques, le premier chez 100 patients avec un schéma chronomodulé [7], le second contre un bras comparateur standard par LV5FU2 [13] : 420 patients ont été inclus avec 51% de réponses dans le bras avec oxaliplatine contre seulement 22% dans le bras sans. La médiane de survie sans progression était augmentée par le traitement combiné d'emblée (9,0 versus 6,2 mois, p=0,0003) alors qu'il n'y a pas de différence de survie globale, celle-ci étant supérieure dans le bras oxaliplatine, mais à la limite de la significativité (16,2 versus 14,7 mois, p=0,12). L'oxaliplatine a ainsi démontré depuis 15 ans sa place de choix dans l'arsenal des traitements de chimiothérapie dans le cancer colorectal métastatique (et adjuvant) et constitue avec le 5-FU et l'irinotecan, la troisième drogue majeure dans cette indication.

Le schéma conjuguant 5-FU et oxaliplatine le plus utilisé en France à l'heure actuelle est le régime FOLFOX4 associant au LV5FU2 classique, 85 mg/m² de L-OHP tous les 15 jours.

Les toxicités de l'oxaliplatine sont représentées par des neutropénies/thrombopénies potentiellement sévères, et par des toxicités neurologiques aiguës et tardives, doses dépendantes, à type de paresthésies pouvant gréver durablement la qualité de vie des patients. Ce profil de toxicité possiblement liée soit à des troubles ioniques au niveau des canaux

sodiques, soit à des troubles de réparation des adduits sur l'ADN des neurones des ganglions spinaux, ainsi que les phénomènes de résistance observée au-delà d'une dizaine de cycles de chimiothérapie, font intervenir de multiples gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (système NER - Nucleotid Excision Repair - ou BER - Base Excision Repair -), sujets de polymorphismes interindividuels.

Dans ce cadre les études de pharmacogénétique pourraient apporter des éléments de compréhension sur les variabilités de réponses et de toxicités permettant un meilleur rationnel dans l'utilisation de l'oxaliplatine (voir TROISIEME PARTIE).

Un essai de phase III multicentrique national, piloté par le GERCOR, a inclus 226 patients qui recevaient le schéma FOLFOX6 (LV5FU2 simplifié, soit sans second bolus de 5-FU au J2 + 100 mg/m² d'oxaliplatine) suivi de FOLFIRI (LV5FU2 simplifié + 180 mg/m² d'irinotecan) - ou la séquence inverse -, en première ligne métastatique avec *cross-over* à la progression. Les résultats retrouvent une équivalence d'efficacité entre les deux régimes thérapeutiques avec 56% et 54% de réponse et 14,4 mois de Temps jusqu'à Progression (TTP) pour la séquence FOLFIRI suivi de FOLFOX contre 11,5 mois pour la séquence inverse. La survie globale était de l'ordre de 21 mois pour les deux régimes (20,4 et 21,5 respectivement). La différence essentielle repose sur les profils de toxicités avec 25% de neutropénies grade 3-4 pour le FOLFIRI, 44% de neutropénies et 34% de neuropathies grade 2 ou plus pour le FOLFOX (dont 20% persistantes sous FOLFIRI), ayant entraîné 36% d'arrêt de traitement [14-15].

Des schémas intensifiés de type FOLFOXIRI ont été étudiés [16], avec d'excellents résultats en terme de réponses objectives mais au prix de toxicités notamment hématologiques sévères (50% de neutropénies de grade 3-4) faisant réserver ce type de régime à des patients jeunes et dans un contexte de curabilité avec notamment des métastases hépatiques potentiellement résecables. Dans le contexte par contre de maladie très évoluée, on privilégiera plutôt au-delà de la deuxième ligne des schémas de monothérapies (capecitabine orale par exemple) ou des pauses thérapeutiques qui n'ont pas montré d'effet délétaire sur la survie globale (Essais OPTIMOX) et dont l'objectif est bien le maintien d'une qualité de vie mise à mal par les venues hospitalières itératives.

3. Les thérapies ciblées.

3.1. Bevacizumab.

Les thérapies ciblées se sont imposées tout au long de la maladie métastatique des cancers colorectaux. Le bevacizumab (Avastin^o), anticorps anti-VEGF, a montré son efficacité dans l'étude pivotale qui a conduit à son AMM [17] aux Etats-Unis comme en Europe, en comparant son association à un schéma américain IFL (Irinotecan et 5-FU bolus) à ce même schéma seul + placebo, avec 20,3 mois de médiane de survie grâce à l'adjonction versus 15,6 sans.

Dans l'étude BICC-C étudiant l'association du bevacizumab à un régime FOLFIRI, plus adapté à nos pratiques courantes, un taux de réponse très intéressant de 63% a été rapporté avec une médiane de survie de 28 mois jamais atteinte jusque là [18].

Concernant un schéma associé au FOLFOX ou XELOX en première ligne, l'étude de première ligne ayant autorisé l'utilisation du bevacizumab avec ces traitements rapportent des résultats moins bons en terme de survie sans progression qu'avec l'irinotecan mais statistiquement significatifs (9,4 mois versus 8, p= 0,023) [19].

Le bevacizumab reste efficace en seconde ligne (12,9 versus 10,8 mois) dans une étude rapportée utilisant un schéma FOLFOX comme bras de référence [20], et l'étude BRiTE, certes observationnelle, va dans ce sens [21]. Au-delà de la deuxième ligne, par contre, un traitement par bevacizumab semble très peu efficace comme le démontre les résultats de l'étude Chen *et al*, publiée en 2006, avec seulement 1% de réponses et une survie sans progression de 3,5 mois chez les patients recevant une chimiothérapie de type 5-FU+ Bevacizumab après échec du FOLFOX et du FOLFIRI [22].

3.2. Anticorps anti-EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*).

Le cetuximab (Erbix^o) comme le panitumumab (Vectibix^o) ont démontré leur efficacité versus des soins de confort dans deux études, après échec du FOLFOX comme du FOLFIRI : respectivement et en terme de survie sans progression 6,1 mois contre 4,6 (p=0,0046) pour le cetuximab, 12,3 semaines versus 7,3 pour le panitumumab dans la sous-population sans mutation du gène Kras [23,24]. Les études CRYSTAL [25] et BOND [26] ont montré les bénéfices de l'adjonction du cetuximab à l'irinotecan en termes de réponses comme de survies, en première comme en deuxième ligne de traitement. En ce qui concerne l'association oxaliplatine-cetuximab, après les résultats très prometteurs de l'étude ACROBAT [27], avec 72% de réponses objectives en phase II et la combinaison FOLFOX, un essai randomisé de

phase II (OPUS) a été mené en première ligne de traitement. Le taux de réponse a été de 36% contre 45,6% pour l'association, alors que plus de 300 patients ont été inclus, soit une différence non significative et un niveau de réponse inférieur à celui observé en phase II. La survie sans progression n'était pas de même modifiée (7,2 mois) [28]. La nécessité d'une recherche du statut Kras reste toutefois indispensable, l'efficacité n'existant qu'en cas d'absence de mutation à ce niveau. D'autres facteurs génomiques prédictifs de résistance sont cependant en cours d'exploration comme le statut des gènes Braf, PI3K (qui font l'objet d'un des travaux de recherche présentés ici) et la perte d'hétérozygotie de PTEN, traduisant bien l'intérêt des études génomiques visant à individualiser les traitements au plus près du clone tumoral. Au delà de ce dernier, il a par ailleurs été rapporté des polymorphismes génétiques constitutionnels au niveau des récepteurs pour la fraction Fc des IgG (FcγR) aboutissant à des variations de réponses aux anticorps monoclonaux induisant une activité cellulaire cytotoxique de type ADCC (Antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity), comme le cetuximab par exemple [29].

C. Conclusion.

De ce tour d'horizon des principaux traitements de chimiothérapies utilisés dans le cancer colorectal métastatique (**Tableaux I à III**), il en ressort que les progrès ont été tout à fait considérables en moins d'une vingtaine d'années dans la prise en charge de cette pathologie, et ce, sans considérer les progrès parallèles dans le domaine des soins de support (traitements antiémétiques, adjonction de facteurs de croissance hématopoiétiques, prise en charge de la douleur, prise en charge psychologique et sociale, etc..) comme dans les nouvelles techniques de chirurgie et de radiologie interventionnelle. L'ensemble de ces thérapies mises en œuvre dans un cadre multidisciplinaire, a ainsi permis de passer d'une survie globale médiane d'environ 6 mois au début des années 90 à plus de 2 ans désormais (**Figure 4**), avec pour certains patients dont la résecabilité des métastases est rendue possible secondairement sous chimiothérapie, un réel espoir de guérison (40% des patients R0 peuvent être considérés comme guéris au-delà de 5 ans), espoir encore inimaginable il y a moins de 10 ans. Les progrès sont toutefois plus importants dans l'obtention de meilleurs taux de réponse objective que sur les survies sans progression ou globale (**Figure 5**).

Tableau I. Résumé des principaux essais et résultats en première ligne métastatique.

Author	No. of pts	Regimen	RR	PFS median	Median survival
<i>5-FU regimens</i>					
De Gramont ⁴⁰	216	Bolus 5-FU/FA	14.4	5.5	14.2
De Gramont ⁴⁰	217	5-FU/FA c.i.	32.6	6.9	15.5
Van Cutsem/Hoff ⁴¹	603	Capecitabine	26	4.6	12.9
<i>OHP regimens</i>					
De Gramont ⁴²	207	FOLFOX-4	50.7	9.0	16.7
Levi ⁴³	186	5FU/FA + OHP chrono	51	6.4	15.9
Cassidy ⁴⁴	96	XELOX	55	7.7	19.5
Goldberg ⁴⁵		FOLFOX	45	8.7	19.5
Tournigand ⁴⁶	81	FOLFOX-6	54	8.0	—
<i>CPT-11 regimens</i>					
Douillard ⁴⁷	199	FOLFIRI	49	6.7	17.4
Saltz ⁴⁸	231	IFL	39	7.0	14.8
Goldberg ⁴⁵	264	IFL	31	6.9	15.0
Tournigand ⁴⁶	69	FOLFIRI	56	8.5	—
Bajetta ⁴⁹	68	XELIRI	47	8.3	—
<i>CPT-11 + OHP regimens</i>					
Falcone ⁵⁰	32	FOLFOXIRI	72	10.8	28.4
Souglakos ⁵¹	31	De Gramont + OHP + CPT-11	58.1	13	—
Abad ⁵²	47	FOLFOXIRI	69		>22
Goldberg ⁴⁵	264	IROX	35	6.5	17.4
<i>Monoclonal antibodies</i>					
Hurwitz ⁵³	402	IFL + Bevacizumab	44.8	10.6	20.3
Kabbinavar ⁵⁴	104	5-FU/FA + Bevacizumab	26	9.2	16.6

Tableau II. Résumé des principaux essais et résultats en deuxième ligne métastatique.

Author	No. of pts	Regimen	RR (%)	PFS median	Median survival
<i>OHP (post-CPT-11 failure)</i>					
Janinis ⁶³	32	OHP/5FU/FA	13	3	9
Kouroussis ⁶⁴	41	FOLFOX-2	17	8.5	12
Ryan ⁶⁵	70	FOLFOX	11	6.2	8.7
Rothenberg ⁶⁶	152	FOLFOX-4	9.9	4.6	9.8
Tournigand ⁴⁶	81	FOLFOX-6	15	4.2	—
Giantonio ⁶⁷	289	FOLFOX-4	—	5.5	10.7
<i>CPT-11 (post-OHP failure)</i>					
Andre ⁶⁸	33	FOLFIRI	6	4.5	10.7
Ulrich-Pur ⁶⁹	38	CPT-11	21	4.8	>9.5
Stickel ⁷⁰	26	CPT-11/5FU/FA	27	5.8	10
Tai ⁷¹	18	FOLFIRI	22.2	—	7.5
Mabro ⁷²	29	FOLFIRI-2	17	4.1	9.7
Tournigand ⁴⁶	69	FOLFIRI	4	2.5	—
<i>Monoclonal antibodies (post-CPT-11 failure)</i>					
Saltz ⁷³	57	Cetuximab	9	1.4	6.4
Cunningham ⁷⁴	111	Cetuximab	10.8	1.5	6.9
Cunningham ⁷⁴	218	Cetuximab + CPT-11	22.9	4.1	8.6
Giantonio ⁶⁷	243	Bevacizumab	—	3.5	10.2
Giantonio ⁶⁷	290	FOLFOX-4 + Bevacizumab	—	7.4	12.5

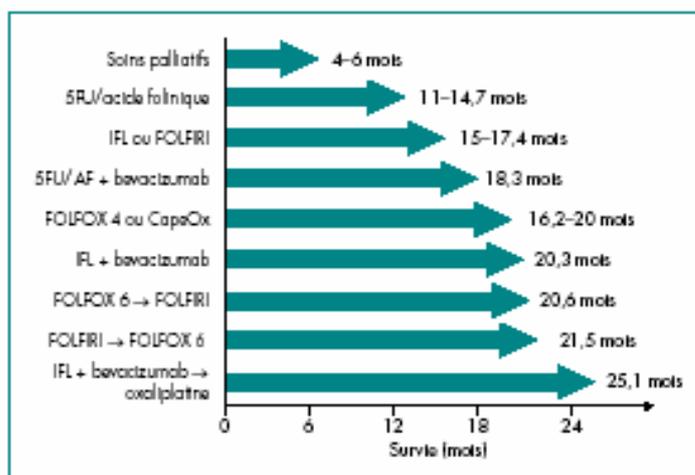


Figure 4. Bénéfices obtenus par les différents protocoles de chimiothérapies en survie médiane depuis 20 ans.

Tableau III. Principales études concernant les combinaisons bithérapies cytotoxiques et biothérapies dans les cancers colorectaux en première ligne.

(d'après La Lettre du Cancérologue Novembre 2009).

Agent ciblé	Chimiothérapie	Essais (référence)	RO (%)	SSP (mois)	SG (mois)
Irinotécan					
Bévacizumab + ...	FOLFIRI	BICC-C (16, 17) ACCORD 13 (23)	58-59	9,0-11,2	23,0-28,0
	CAPIRI/XELIRI	AIO 0604 (18) ACCORD 13 (23)	54-55	9,0-12,1	23,0-NA
	Irinotécan (total)		54-59	9,0-12,1	23,0-28,0
Cétuximab + ...	CAPIRI	AIO 0604 (57)	54	6,7	NA
	FOLFIRI	AIO 0604 (57) CRYSTAL (37)	45-47	8,6-8,9	17,4-19,9
	Irinotécan (total)		45-54	6,7-8,9	17,4-19,9
Oxaliplatine					
Bévacizumab + ...	FOLFOX	TREE-2 (20) NO16966 (19)	47-52	9,4-9,9	26,0
	CapeOX/CAPOX/XELOX	TREE-2 (20) AIO 0604 (18) CAIRO-2 (21) NO16966 (19)	44-53	9,3-10,7	20,4-27,0
	Oxaliplatine (total)		44-53	9,4-10,7	20,4-27,0
Cétuximab + ...	CAPOX	AIO 0604 (57)	59	7,9	NA
	FOLFOX	AIO 0604 (57) OPUS (39)	43-46	8,3	18,9
	Oxaliplatine (total)		43-59	7,9-8,3	18,9
Bévacizumab + ...	Irinotécan ou oxaliplatine (total)		44-59	9,0-12,1	20,4-28,0
Cétuximab + ...	Irinotécan ou oxaliplatine (total)		43-59	6,7-8,9	17,4-19,9

NA : non atteinte.

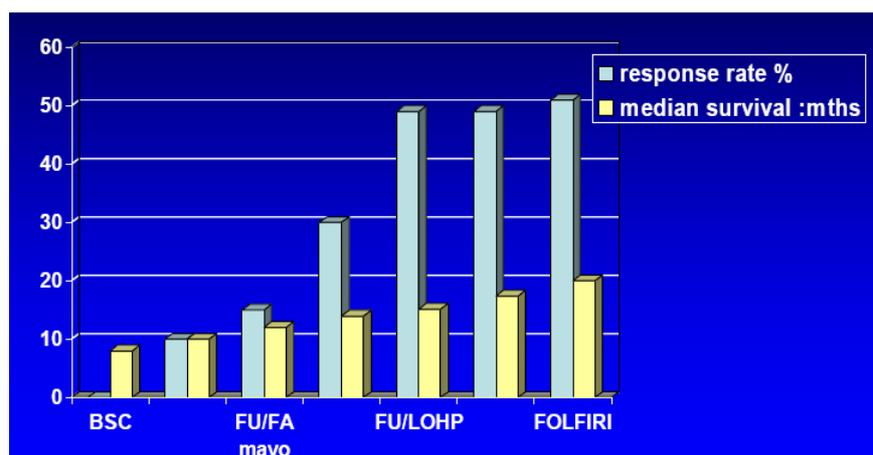


Figure 5. Bénéfices comparés entre les taux de réponse objective et la survie globale selon traitements.

A l'heure actuelle, 3 situations distinctes peuvent être isolées (Figure 6) qui vont déterminer la prise en charge et le choix réservé aux traitements, prenant en compte leurs efficacités mais également les effets secondaires qui leur sont inévitablement liés et dont l'acceptabilité pour le patient comme pour le praticien dépend de l'objectif du traitement :

- ✓ *Situation d'opérabilité immédiate* des métastases et dans le même temps que la tumeur primitive, suivie d'une chimiothérapie adjuvante (FOLFOX).
- ✓ *Situation de résecabilité « envisageable »* (un seul site métastatique hépatique par exemple) après une chimiothérapie de première voire deuxième ligne : le choix du traitement portera sur les protocoles offrant les meilleurs taux de réponses objectives (RO) et en considérant les effets secondaires en fonction du terrain sous-jacent.
- ✓ *Situation de résecabilité « inenvisageable »* (métastases multi-sites et en trop grand nombre) : La qualité de vie doit prévaloir, ainsi que les protocoles offrant les meilleurs temps médians de survie sans progression. Le temps jusqu'à progression (TTP) est en effet un « surrogate marker », soit un marqueur de substitution prouvé de la survie globale dans le cancer colorectal [30-31]: un temps médian jusqu'à progression augmenté aura un impact sur la survie globale.

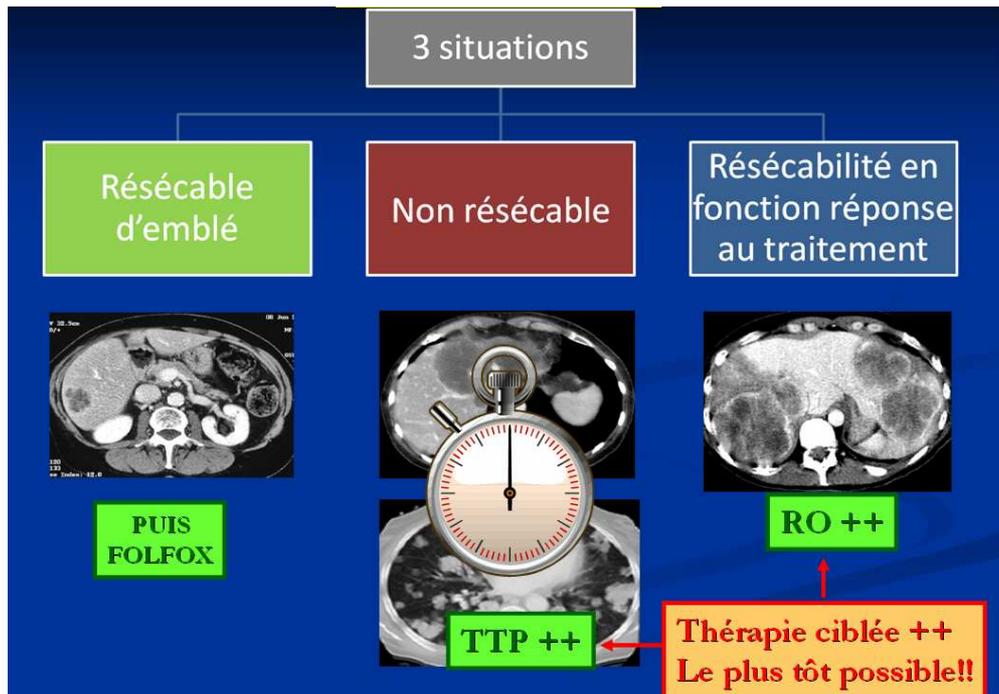


Figure 6. Les différents objectifs de traitement en situation métastatique.

Pour chacune de ces situations, **l'exploration pharmacogénétique** que nous définirons dans le chapitre suivant **pourrait être d'une aide majeure pour le praticien** : *En cas de résectabilité immédiate*, le choix de la chimiothérapie « adjuvante » pourra être guidé par le métabolisme du patient (risque de toxicité rédhibitoire à l'oxaliplatine par exemple) ; *dans la situation de recherche de la meilleure réponse objective d'emblée*, un schéma d'intensification de traitement, autorisé par des polymorphismes liés à des mécanismes de métabolisation « rapide » pour le médicament concerné (UGT1A1 6/6 concernant l'irinotecan par exemple) offre au patient les meilleures et les plus rapides chances de résectabilité, critère indispensable à une possible guérison, en évitant l'échec prévisible de traitements inutiles avec toxicités et perte de chance. *Enfin, dans le cas d'une situation définitivement palliative*, la recherche de polymorphismes liés à des risques majeurs de toxicités privilégie la qualité de vie du malade et permet d'éviter des traitements inutilement lourds. **Notre travail de thèse a ainsi porté sur les 3 cytotoxiques de référence (5-Fluorouracile, irinotecan et oxaliplatine) dans le cancer colorectal dans le but de viser *in fine* chacun de ces objectifs.**

**II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA
PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX
CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE**

**2. INTERET DE LA PHARMACOGENETIQUE
EN ONCOLOGIE MEDICALE**

1. Définition

La réponse à tout traitement médicamenteux est très variable d'un individu à l'autre, tant sur le plan pharmacologique (efficacité recherchée) que sur le plan des toxicités (effets indésirables). Alors que la variabilité de cette réponse, souvent difficile à prévoir, est déjà une limitation importante à l'utilisation « rationnelle » des médicaments « classiques », elle devient un problème majeur en cancérologie compte tenu d'une fenêtre thérapeutique étroite avec un risque vital potentiellement engagé pour le malade. Parallèlement un schéma de traitement (molécules utilisées, posologies, rythme d'administration) insuffisamment efficace engage à plus ou moins long terme le pronostic de survie du patient du fait d'un contrôle insuffisant de la maladie tumorale en situation métastatique, et peut favoriser des rechutes après traitement adjuvant « inadéquate » par le développement de micrométastases non éradiquées. **La rationalisation des traitements de chimiothérapie est donc cruciale dans ce contexte.**

En dehors d'erreurs d'indications, de posologie ou d'utilisation, qui participent pour une large part à l'inefficacité et à la toxicité des chimiothérapies, les causes de variabilité de réponses aux traitements peuvent être d'origine multiples :

- *physiopathologiques* : âge, grossesse, insuffisance cardiaque, hépatique ou rénale, pathologies (infections) associées...
- *environnementales* : alimentation (jus de pamplemousse et irinotecan), coadministration de médicament (interférences), tabac...
- *génétiques* : variations génétiques du métabolisme et du transport des médicaments, des cibles pharmacologiques (**Figure 7**) [32].

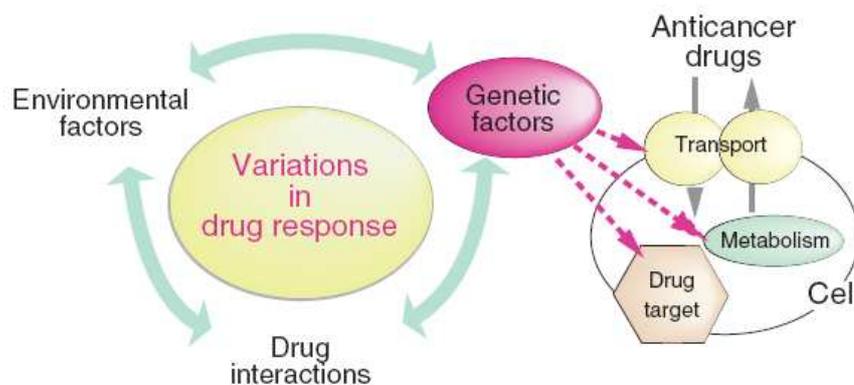


Figure 7. Interaction facteurs génétiques-médicaments-cellule tumorale.

La pharmacogénétique étudie les mécanismes d'origine génétique intervenant dans la variabilité interindividuelle de la réponse aux traitements, avec pour objectif le développement de tests simples permettant d'identifier les individus exposés aux effets indésirables [33]. Le terme de « pharmacogénétique » a été proposé dès la fin des années 1950, à la suite de la démonstration du caractère héréditaire de la survenue d'hémolyse en cas d'administration d'agents antimalariques, chez des malades présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase [34-35]. Depuis, de très nombreux exemples d'anomalies de réponse aux médicaments liées à des facteurs génétiques ont été décrits [36-39].

2. Métabolisme et transport des médicaments

Les médicaments représentent une part importante des xénobiotiques auxquels l'homme est exposé en permanence. Ils sont généralement de nature hydrophobe et doivent être métabolisés en composés hydrophiles pour être plus facilement éliminés dans la bile et/ou dans les urines [32]. Après administration orale, les médicaments doivent pénétrer dans le compartiment vasculaire pour atteindre leur cible, en franchissant la barrière intestinale, au niveau de laquelle il existe des transporteurs destinés à les expulser (phase « 0 » du métabolisme, représentée par exemple par la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène MDR1 ou ABCB1). Le métabolisme est ensuite essentiellement hépatique et les enzymes qui participent à la biotransformation des médicaments sont schématiquement divisés en trois groupes :

- *les enzymes de phase I* qui sont des enzymes de fonctionnalisation (oxygénases, oxydoréductases, hydrolases), qui rendent les molécules plus polaires (par hydroxylation ou désalkylation par exemple). Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYP) catalysent la grande majorité des réactions de phase I
- *les enzymes de phase II*, qui sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison, et rendent les métabolites encore plus hydrophiles, par greffage d'un radical acétyl, sulfate, glucuronate, méthyl, ou glutathion.
- enfin, pour être éliminés hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par *des protéines de phase III*, qui appartiennent à la même famille que la P-gp : les protéines ABC (ATPbinding cassette : par exemple ABCC1 ou MRP1 dans l'ancienne nomenclature, ABCC2...).

Ces différentes protéines enzymatiques et de transport partagent plusieurs propriétés :

- Elles appartiennent à des superfamilles comprenant de nombreuses isoformes qui possèdent de fortes homologies dans leurs séquences en acides aminés.
- Elles ont une spécificité de substrat relative et chevauchante. Enfin leur expression, voire leur activité, est très variable en fonction de facteurs physiopathologiques, environnementaux et génétiques (polymorphismes génétiques).

3. Polymorphismes génétiques

Tout gène (y compris ceux codant pour les enzymes intervenant dans les réactions de biotransformations des médicaments) peut présenter des anomalies de séquences ponctuelles ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), des délétions partielles ou totales, ou encore des duplications ou amplifications. Ces différentes versions d'un même gène définissent des allèles et chaque individu possède deux versions alléliques d'un même gène, identiques ou différentes déterminant un génotype particulier. L'existence dans la population générale de ces différents allèles d'un même gène, et, par conséquent, de différents génotypes, définit un polymorphisme génétique. Dans la définition classique du polymorphisme génétique s'ajoute une notion de fréquence arbitraire, précisant que l'allèle le moins fréquent doit présenter une fréquence au moins égale à 1 % [40].

Les mutations qui affectent les gènes des enzymes peuvent être responsables de variations d'expression et/ou d'activité de ces protéines, en entraînant une diminution ou une augmentation de l'activité ou encore une absence totale de la protéine enzymatique [36], avec des conséquences très variables sur le profil de tolérance et d'efficacité (**Figure 8**).

Les polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme des médicaments s'expriment dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques, définissant, dans le cas le plus général, deux groupes d'individus dits métaboliseurs lents (déficit d'activité enzymatique) et métaboliseurs extensifs ou rapides (activité enzymatique normale). L'existence de métaboliseurs dits ultrarapides (activité enzymatique augmentée) ou intermédiaires (activité enzymatique réduite) est également reconnue pour certaines enzymes polymorphes [36].

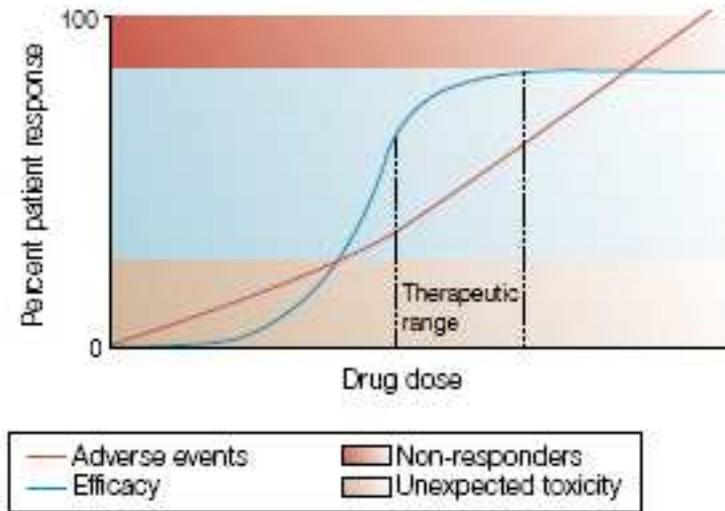


Figure 8. Relation entre doses, efficacité et toxicité.
(d'après Relling *et al.* Nature Review 2001)

Des études de familles ont permis d'établir que le phénotype lent se transmet généralement sous le mode autosomique récessif, c'est-à-dire que les individus Métaboliseurs Lents sont, au niveau de leur génotype, homozygotes ou hétérozygotes composites pour un ou deux allèle(s) non-fonctionnel(s) du gène. La fréquence de ces différents phénotypes est variable dans la population en fonction de l'enzyme polymorphe et, pour une même enzyme, variable en fonction de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées [41] (**Figure 9**).

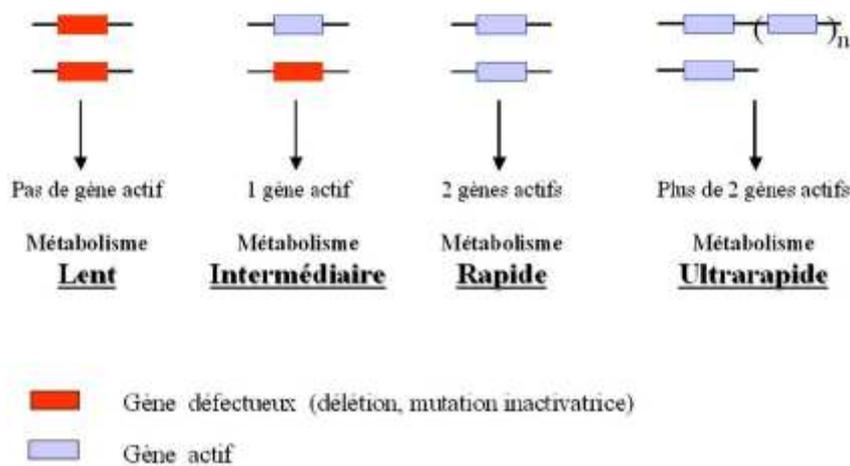


Figure 9. Bases moléculaires du polymorphisme génétique.

4. Prédiction de la réponse aux médicaments : phénotypage ou génotypage.

Deux approches méthodologiques peuvent être utilisées pour déterminer la capacité métabolique d'un individu vis-à-vis d'une enzyme donnée : *le phénotypage et le génotypage*.

- *Les méthodes de phénotypage* reposent soit sur une mesure de l'activité enzymatique soit sur l'administration d'un substrat-test (en général un médicament), suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et/ou de leurs métabolites à partir d'un échantillon biologique, urinaire ou sanguin. On détermine le rapport métabolique entre la quantité de substance retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s), qui est le reflet de l'activité enzymatique étudiée. Dans le cas des études qui feront l'objet du Travail de Thèse présenté ici, le rapport de l'activité métabolique du 5-FU a été rendu possible par les dosages en Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) du DihydroUracile (UH2) et de l'Uracile (U).

- *Les méthodes de génotypage* reposent sur l'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire, la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) étant généralement à la base des méthodes utilisées en routine. Ces méthodes nécessitent le recueil préalable, par des techniques peu ou non invasives, d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique de l'individu. La stratégie de génotypage appliquée est fonction d'un certain nombre de paramètres, en particulier la nature des mutations à identifier (mutations ponctuelles, délétion ou amplification du gène...) et le nombre de mutations à identifier pour obtenir un taux d'efficacité de prédiction du phénotype le plus élevé possible (fonction de la fréquence des polymorphismes dans la population étudiée). L'avantage majeur de la détermination du phénotype par génotypage réside dans le fait qu'elle n'est pas soumise à l'influence de facteurs confondants (coadministration de médicaments, pathologies associées...) mais elle peut être fastidieuse en raison du nombre parfois élevé de mutations à détecter.

5. Application en Cancérologie.

On estime aux USA que 7% environ des patients présentent des effets secondaires graves aux traitements médicamenteux entraînant 100 000 décès par an. Concernant les anticancéreux,

les effets toxiques engendrés sont souvent sévères (20 à 25% de toxicité de grade 3-4 et 0.2% de mortalité), grèvent la qualité de vie des patients, peuvent mettre en jeu le pronostic vital, ou simplement retentissent sur la conduite et l'efficacité du traitement et donc sur la survie globale. Parmi les facteurs de potentiel échec prévisible d'un traitement de chimiothérapie, non dénué de risques donc, ou parmi les facteurs potentiels de toxicité, on trouve les variations interindividuelles du métabolisme qui influencent les capacités d'anabolisme et de catabolisme des médicaments. Ces capacités variables sont donc, comme nous l'avons vu, reliées à des modifications génétiques des enzymes du métabolisme, des récepteurs et des transporteurs des traitements anticancéreux. Selon le type de polymorphismes et leur localisation, chez l'hôte (pharmacogénétique) ou au niveau de la cellule tumorale (pharmacogénomique), la réponse au traitement anticancéreux en sera affectée (**Figure 10**) :

- **Cas a :** Existence de polymorphismes à la fois chez l'hôte et la tumeur régulant la biodisponibilité de l'agent anticancéreux, l'efflux et la rétention, et déterminant si l'agent peut être actif sur la tumeur.
- **Cas b :** Nombreux polymorphismes tumoraux affectant la sensibilité à l'agent et indispensables à l'agressivité tumorale (gènes tels que p53, dihydrofolate réductase ou topoisomérase II)
- **Cas c :** Polymorphismes germinaux intervenant dans la tolérance au traitement : haut risque de toxicité mais polymorphismes (si conservés dans le génome tumoral) ayant peu d'intérêt dans l'expansion tumorale (gènes tels que Thiopurine methyl transferase ou Dihydropyrimidine Dehydrogenase).

En résumé la pharmacogénomique cherche à corréler des polymorphismes situés au sein du génome tumoral à des résistances prévisibles aux traitements anticancéreux, tandis que la pharmacogénétique cherche à rapprocher des polymorphismes du génome germinale (de l'hôte) aux profils de toxicités prévisibles . On peut néanmoins remarquer que

- d'une part la plupart des polymorphismes germinaux se retrouvent au niveau de l'ADN tumoral : les résultats sur ADN génomique peuvent donc pour une large part être extrapolés à l'ADN tumoral. Ceci n'est pas vrai bien sûr pour les mutations retrouvées au niveau des voies transductionnelles, impliquées très tôt dans la carcinogenèse et pour lesquelles l'étude du génotype tumoral est indispensable. Par ailleurs en cas de perte d'hétérozygotie, comme c'est par exemple très fréquemment le cas dans les cancers colorectaux concernant le

chromosome 18 - porteur du gène de la Thymidylate Synthetase (TYMS) -, les résultats observés doivent être interprétés avec précaution, ce d'autant que les métabolismes et mécanismes de régulations des enzymes impliquées dans le cycle cellulaire sont très probablement notablement différents dans une cellule dérégulée comme la cellule tumorale par rapport à un leucocyte circulant

- que d'autre part un polymorphisme renforçant l'activité d'une chimiothérapie peut alors être également corrélé à un profil prévisible de plus grande toxicité : c'est le cas par exemple de la Méthyltétrahydrofolate deshydrogénase (MTHFR), comme nous le verrons plus loin concernant le 5-Fluorouracile.

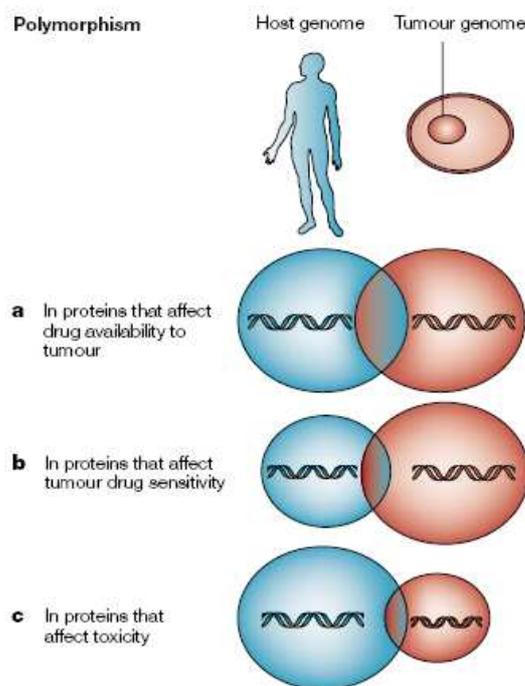


Figure 10. Localisations des polymorphismes et retentissement attendu.

(d'après Relling *et al.* Nature Reviews 2001)

L'importance relative de chaque polymorphisme (hôte ou cellule tumorale) dans le retentissement clinique est exprimée par la taille des cercles ; le degré d'interaction entre les polymorphismes par la taille du recouvrement des cercles.

Le concept séduisant de pharmacogénétique - a priori donc plus simple dans sa réalisation et son exploitation pratique que l'exploitation du matériel tumoral -, fait désormais l'objet d'une véritable réflexion dans les grands congrès internationaux (le dernier congrès américain d'Oncologie Médicale ASCO 2009 mettait d'ailleurs en exergue cette voie de recherche translationnelle).

Mais qu'en est-il de la réalité sur le terrain ? A ce jour, malheureusement, **l'individualisation thérapeutique**, paraissant pourtant si évidente, **n'est toujours pas de pratique courante** dans la plupart des services assurant la délivrance des soins aux patients cancéreux.

Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cet état de fait :

- ✓ Dans la plupart des cas et dans le contexte de « Médecine basée sur la preuve », les données conclusives définitives (niveau de preuve A) manquent car les études sont le plus souvent basées sur des données rétrospectives et sur des cohortes de patients de faible ampleur.

- ✓ Il existe avant tout et de manière évidente un déficit de communication de ce type de recherches translationnelles auprès des praticiens de terrain : les études sont nombreuses mais les résultats très souvent contradictoires tendant à décourager de leurs futures exploitations. A cela, un point à noter : les contradictions « apparentes » sont très souvent la résultante d'une part d'une confusion entre les résultats issus d'études ayant pour objet l'ADN tumoral et d'autres ciblant les polymorphismes de l'ADN germlinal, et d'autre part la grande hétérogénéité des patients comme de leurs traitements dans la recherche de facteurs de corrélation. Enfin les métabolismes complexes impliqués dans la pharmacobiologie des chimiothérapies anticancéreuses (voies cataboliques, nom des enzymes, interaction, implications dans le cycle cellulaire) rendent peu lisibles pour le plus grand nombre une littérature scientifique vécue comme de « Biologie Fondamentale » sans en discerner les applications pratiques futures. Cependant des exemples caricaturaux par leur (apparente) simplicité comme les mutations de KRas associées à l'échec de traitements par anticorps anti-EGFR, et l'utilisation de plus en plus répandue des thérapies ciblées tendent à rapprocher le pragmatisme médical des notions complexes de biologie cellulaire. Dans ce contexte et à l'avenir, la pharmacogénétique devrait ne plus être marginalisée et même être intégrée en tant que telle dans le cursus des jeunes générations d'oncologues.

- ✓ Les concepts anciens et bien ancrés du développement des médicaments anticancéreux « classiques » basés d'une part sur la notion de surface corporelle, ne reposant pourtant sur aucune justification expérimentale et théorique et représentant un frein aux nouveaux raisonnements pharmacologiques, et d'autre part sur des adaptations de

doses basées sur l'observation et la gradation des toxicités cliniques font finalement prescrire des protocoles de chimiothérapies à des posologies standardisées fondées sur des données statistiques d'efficacité et de tolérance théoriques, prenant en compte les populations de métabolisme « intermédiaire » ou « rapide » (80 à 90% des cas), mais négligeant les populations extrêmes à risques, soit d'inefficacité pour les métaboliseurs « ultrarapides », soit de toxicités pour les métaboliseurs « lents ».

- ✓ La difficulté à mettre en évidence pour la plupart des médicaments l'(es) enzyme(s) majeure(s) impliquée(s) dans les phénomènes de résistances et/ou dans les risques de toxicités ; ces mécanismes étant le plus souvent complexes et faisant intervenir plusieurs niveaux métaboliques imbriqués.
- ✓ Les protocoles actuels étant basés le plus souvent sur des polychimiothérapies, l'influence éventuelle d'un facteur de toxicité concernant une molécule peut être « lissée », « annulée » ou « majorée » par le métabolisme des autres traitements de chimiothérapie. A cela, se rajoutent des toxicités communes. Ainsi les analyses rétrospectives statistiques cherchant à dégager des facteurs de corrélation en uni- et *a fortiori* en multivariée sont rendues difficiles par les nombreux biais évidents qui en découlent, ce d'autant que les effectifs rapportés dans la littérature sont faibles.
- ✓ Dans le même ordre d'idée, les nombreux facteurs de confusion liés à la prise concomitante pendant tout le temps des traitements anticancéreux, d'autres traitements dits de « support » (corticothérapie, antiépileptiques, antisécrétoires, etc...) rendent potentiellement peu lisibles les résultats de corrélation, des voies métaboliques communes (notamment au niveau hépatique via les cytochromes) pouvant très largement interférer.
- ✓ L'application du concept « d'individualisation thérapeutique » implique des laboratoires experts, ayant démontré leurs possibilités techniques avec validation en routine des recherches pré- et per-traitements qu'elles soient de nature génotypiques ou phénotypiques. Ces laboratoires labellisés sont finalement peu nombreux sur le territoire français ce qui constitue un frein au développement de telles techniques en pratique courante, d'autant que le nombre d'examen du fait de l'augmentation croissante du nombre de malades dans les futures années s'accompagnera de besoins

parallèles en personnels comme financiers. La constitution de cancéropôles et de centres régionaux de recherche centralisée devrait néanmoins améliorer cette situation à l'avenir.

Malgré tous ces écueils potentiels, l'idée de l'utilisation de la pharmacogénétique en complément des autres avancées scientifiques tend à s'étendre et fait l'objet de plusieurs revues dans des publications internationales [42-46], focalisant l'intérêt d'une telle démarche à la fois dans l'optimisation des réponses aux traitements - et donc sur les survies - , mais également sur la diminution des effets secondaires graves qui représentent non seulement un coût humain, mais aussi financier pour les systèmes de Santé des pays occidentaux et/ou des compagnies privées d'assurance (notamment aux USA) : hospitalisations prolongées, retard à la mise en route des traitements, mauvais contrôle des symptômes donc augmentation du nombre de ponctions par exemple, des séjours médicaux...etc.

Les tableaux IV et V illustrent les principales enzymes ayant fait l'objet du plus grand nombre de communications et d'articles ces dernières années, ainsi que le retentissement sur le plan clinique d'éventuels polymorphismes à leurs niveaux, tant en terme d'efficacité que de toxicité. Certaines d'autres elles sont représentées dans notre travail de Thèse et seront discutées et détaillées plus loin.

Enfin, dernier argument sur la légitimité d'une telle démarche : si le praticien peut « tolérer » jusqu'à un certain point des effets secondaires potentiellement graves dans le contexte d'une maladie évoluée à pronostic vital engagé, il apparaît totalement inacceptable et disons-le « non éthique » de ne pas proposer des dépistages réglés de pharmacogénétiques, quand ils sont l'objet d'abondantes communications (exemple de l'enzyme du catabolisme DPYD dans le cas du 5-Fluorouracil, nous y reviendrons), et dans le cas particuliers des traitements adjuvants, situations cliniques où le(a) patient(e) est déjà potentiellement guéri(e).

Tableau IV. Polymorphismes, incidences, types de cancers concernés, et conséquences métaboliques. D'après Shimoyama S et al. [45].

Enzyme	Mutation	Tumor type or regimen	Significance	Frequency
DPD	Most frequent IVS14+1G>A ¹⁴⁻²⁰	Nasopharyngeal, ¹⁵ colorectal, ¹⁵⁻¹⁷ breast, ¹⁶ pancreas, ¹⁶ esophagus ¹⁶	Activity ↓, toxicity ↑ ^{14,17}	Range from 0% in Asians to 3% in Caucasians
DHP	G833A (Gly278Asp) ⁴³	Breast	Activity ↓, toxicity ↑	< 0.5%
TS	NTR ^{45,55}	Healthy subjects	Decreased TS activity by decreased NTR	Increased number in Africans. Caucasians (2R; 19%, 3R; 38%) Chinese (2R; 2%, 3R; 67%) 3RC; 15% in African Americans, 26% in Hispanics, 30% in Chinese, and 33% in Whites
	G>C in USF binding sequence ⁶⁰	Healthy subjects and bladder	Activity ↓	9% in Hispanic Whites, 22% in non Hispanic Whites, 29% in African Americans, and 56% in Chinese
	6-bp del in 3'-UTR ⁶⁶	Colorectal	Activity ↓	
MTHFR	C677T (Ala222Val) ^{74,75,77}	Healthy subjects ⁷⁴ , colorectal ⁷⁵	Activity ↓	< 1% in Blacks, 10% in Caucasians, and > 20% in Italians and Hispanics ⁷⁴ 10% in Africans, 30% in Caucasians, and 45% in Italians and Mexicans ⁷⁵ Europe (north < south), America (west < south) ⁷⁷
	A1298C (Glu429Ala) ⁷⁹	ND	Activity ↓	4–12% in Europe and North Americans, 4% in Japanese and Chinese
OPRT	G638C (Gly213Ala) ⁸⁵	Colorectal	Activity ↑, severe toxicity	9% in Japanese
	G1285C (Gly429Arg) ⁸⁵	ND	Not clarified	ND
	T326G (Val109Gly) ⁸⁵	ND	Not clarified	ND
	A286G (Arg96Gly) ⁸⁵	ND	Not clarified	ND
	440G poly ⁸⁵	ND	Silent	ND
GST-pi	A1404G (Ile105Val) ^{92,93}	Lung, colorectal ⁹³	Activity ↓	19% in African Americans, 7% in European Americans, 3% in Taiwanese ⁹²
	C2294T (Ala114Val) ^{92,93}	Lung, colorectal ⁹³	Reduced activity	9% in Australian European ⁹³ almost 0%
ERCC2	A751C (Lys224Gln) ¹⁰⁴	5FU alone or with irinotecan	Survival ↓	ND
	G312A (Asp224Asn) ¹⁰⁴		Not relate to survival	ND
	C156A (higher to lower usage codon) ¹⁰⁴		Not relate to survival	ND
ERCC1	C118T (higher to lower usage codon) ¹¹⁰	Colorectal, 5FU with oxaliplatin	Response to chemotherapy ↑	ND
	C8092A ¹¹³	Lung, platinum-based	Survival ↓	ND

DHP; dihydropyrimidinase; DPD; dihydropyrimidine dehydrogenase; ERCC; excision repair cross complementary group; GST; glutathione S transferase; MTHFR; methylenetetrahydrofolate reductase; ND; not determined; NTR; number of tandem repeat; OPRT; orotate phosphoribosyl transferase; TS; thymidylate synthase; USF; upstream stimulatory factor; UTR; untranslated lesion.

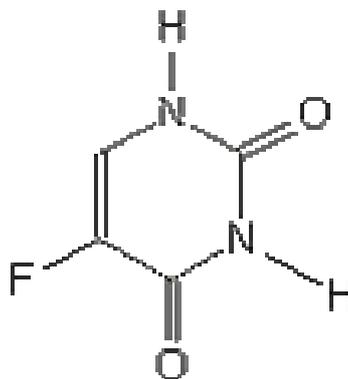
Tableau V. Exemples de polymorphismes associés à des variations de réponses aux agents anticancéreux. D'après Lee et al. [46].

	Substrates	Clinical Phenotype
Drug-metabolizing enzyme		
Phase I		
CYP3A4/3A5	etoposide (Etopophos [®] ; Bristol-Myers Squibb; Princeton, NJ, http://www.bms.com), teniposide (Vumon [®] ; Bristol-Myers Squibb), paclitaxel (Taxol [®] ; Bristol-Myers Squibb), vincristine (Oncovin [®] ; Eli Lilly and Company; Indianapolis, IN, http://www.lilly.com)	interindividual variability in pharmacokinetics
Phase II		
TPMT	6-MP, thioguanine, azathioprine (Imuran [®] ; Prometheus Laboratories, Inc., San Diego, CA http://www.prometheus-labs.com)	hematopoietic toxicity; dose adjustment required
UGT1A1	irinotecan (Camptosar [®] ; Pfizer Pharmaceuticals; New York, NY, http://www.pfizer.com)	toxicity (diarrhea, neutropenia)
NAT	amofide (Quinamed [®] ; ChemGenex Pharmaceuticals Ltd, Menlo, CA, http://www.agtbiosciences.com)	myelotoxicity; dose adjustment required for fast acetylators
GSTM1, GSTM3, GSTT1	various anticancer agents	decreased efficacy
Non-P450 phase I		
DPD	5-FU	severe treatment-related toxicity
Drug transporters		
P-glycoprotein (MDR1)	various anticancer drugs	drug resistance; interindividual variability in pharmacokinetics
MRPs	various anticancer drugs	drug resistance; interindividual variability in pharmacokinetics
Drug targets		
MTHFR	5-FU and antifolates	toxicity; drug resistance
TS	5-FU and antifolates	drug resistance

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; DPD = dihydropyrimidine dehydrogenase; GST = glutathione S-transferase; MDR1 = multidrug resistance 1; MRP = multidrug-resistance-related protein; MTHFR = 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; NAT = N-acetyl transferase; TPMT = thiopurine methyltransferase; TS = thymidylate synthase; UGT1A1 = UDP-glucuronosyltransferase 1A1; 5-FU = 5-fluorouracil; 6-MP = 6-mercaptopurine.

**II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA
PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX
CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE**

3. PHARMACOLOGIE DU 5-FLUOROURACILE



Le 5-fluorouracile (5-FU), antimétabolite connu depuis presque un demi-siècle [47], est l'un des plus anciens médicaments anti-cancéreux et reste encore à l'heure actuelle utilisé dans le traitement de nombreuses tumeurs solides (sein, colon, ORL). Dans le cadre du cancer colorectal, il représente depuis le début des années 90 le standard du traitement car ayant apporté un gain en terme de survie globale et de survie sans symptôme, ceci sans altération de la qualité de vie, par rapport aux soins de confort [1,2].

Malgré l'avènement de nouvelles molécules telles que le raltitrexed, l'irinotécan ou encore l'oxaliplatine développées à partir de 1995, le 5-FU reste le cytotoxique de référence seul ou en association dans cette pathologie tant en situation adjuvante que métastatique. L'adjonction dans les schémas de traitement de modulateurs d'activité tel que l'acide folinique, a permis l'optimisation de son efficacité par stabilisation de l'inhibition de la thymidylate synthase (TYMS), cible principale [48]. Une méta-analyse a ainsi montré un gain en terme de réponse (passant de 10 à 23%) bien que sans effet sur la survie globale [3].

Assez paradoxalement compte tenu de l'ancienneté de son utilisation, le meilleur schéma d'administration du 5-FU reste encore à l'heure actuelle sujet à controverses [49] : Perfusion bolus versus perfusion continue avec des profils de réponse et de tolérance si différents que l'on peut considérer ces deux modalités comme des traitements distincts [50], fréquence des perfusions, posologies du 5-FU et de l'acide folinique, autant de paramètres qui restent à optimiser.

De même, l'existence d'un effet dose du 5 FU, justifie le concept de schémas d'administration dit "intensifiés", intensification des posologies qui se heurtent inévitablement, du fait du faible index thérapeutique de la molécule à l'instar de la plupart des autres agents anticancéreux, à l'apparition de toxicités parfois sévères, voire mortelles donc inacceptables.

De ce constat découle depuis quelques années une nouvelle approche basée cette fois sur la *pharmacogénétique*, prenant en compte le génome de l'hôte (polymorphisme), prédictive de la tolérance à la chimiothérapie, et sur la *pharmacogénomique*, étudiant le génome tumoral (profil d'expression et mutations des gènes cibles), qui serait prédictive de la réponse au traitement.

Cette voie de recherche considérant la pharmacologie clinique, biologique et génétique de l'hôte comme de la tumeur, pourrait ainsi permettre d'optimiser au mieux l'intensification de doses - et donc l'efficacité de la chimiothérapie -, tout en limitant les toxicités, avec *in fine* la proposition d'un traitement individualisé contrastant largement avec la pratique actuelle du traitement standardisé.

Dans ce cadre, trois enzymes impliquées dans l'activité ou le métabolisme du 5-FU ont été particulièrement étudiées : La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD), enzyme principale de son catabolisme, la thymidylate synthase (TYMS), sa cible principale, et plus récemment la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dont le rôle dans le métabolisme des folates participe à la modulation de son activité. Chacune de ces enzymes présente une variabilité d'expression individuelle du fait de polymorphismes génétiques.

1. Le métabolisme du 5-Fluorouracile : Généralités.

1.1. Le 5-Fluorouracile est une fluoropyrimidine de la classe des antimétabolites, différant de l'uracile par la substitution d'un atome de fluor sur le carbone 5. Interférant avec la synthèse des acides nucléiques, son action est donc cycle-dépendant et majeure pendant la phase S du cycle cellulaire.

La demi-vie après injection intra-veineuse en bolus est très courte (entre 8 et 22 minutes). Le volume de distribution est par contre très large (de 14 à 54 litres) avec une clairance se situant entre 0,5 et 2 l/min, non linéaire et variant avec la dose administrée. Le métabolisme est essentiellement hépatique (95%), l'élimination urinaire restant faible de l'ordre de 5 à 10 % sous forme principalement inchangée. Lors de perfusions continues prolongées, il existe une participation pulmonaire à l'extraction du toxique pouvant atteindre 50%. Par ailleurs la fixation aux protéines plasmatiques est faible (10%).

Après pénétration dans la cellule, le métabolisme du 5 FU est représenté par deux voies compétitives : La voie anabolique le transformant en nucléotide responsable de son activité cytotoxique et la voie catabolique aboutissant à la formation de composés inactifs, produits d'élimination (**Figure 11**).

- **La voie catabolique :** La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD) est l'enzyme principale et limitante. Elle réduit très rapidement près de 80 % du 5 FU en 5,6-dihydro-5-fluorouracile (5-FUH2). Ce 5-FUH2 est ensuite clivé par

la dihydropyrimidinase aboutissant à l'acide α -fluoro- β -uréidopropionique (FUPA) finalement métabolisé en α -fluoro- β -alanine (FBAL), catabolite principal du 5 FU, par l'uréidopropionase.

- **La voie anabolique, plus complexe: Trois voies essentielles peuvent être individualisées.**

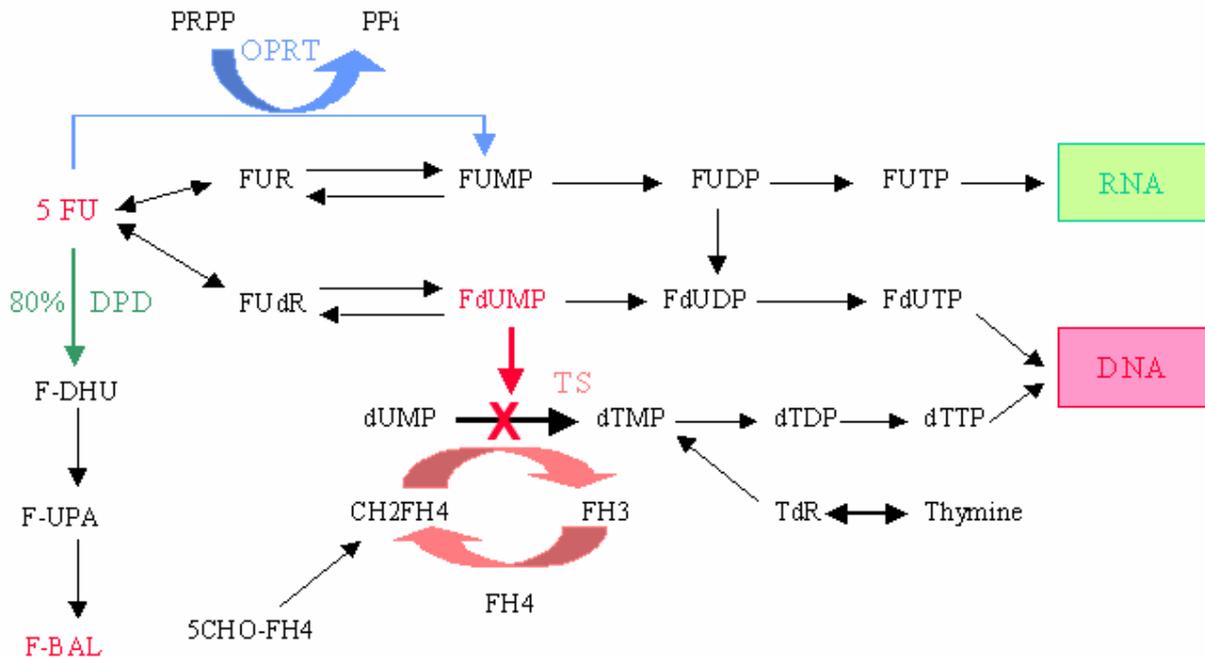


Figure 11. Métabolisme du 5 FU. OPRT = Orotate phosphoribosyltransferase.

A/ Une voie principale via son métabolite FdUMP correspondant à l'inhibition de la thymidylate synthase (TYMS) aboutissant à l'apparition de coupures intra brins et à des mécanismes d'apoptose par l'inhibition de la biosynthèse de l'ADN via le taux d'expression de la protéine Fas [51,52], elle-même régulée par le statut génomique, sauvage ou muté, de l'anti-oncogène p53 [53].

B/ L'incorporation par l'intermédiaire du métabolite triphosphaté 5-FUTP, mimant en taille l'UTP, dans l'ARN au cours des mécanismes de transcription, aboutissant à des altérations fonctionnelles avec anomalie de la maturation post-transcriptionnelle.

L'incorporation dans les différents types d'ARN est possiblement liée aux toxicités observées notamment au niveau digestif [54]. *Ce mécanisme est plus particulièrement en cause dans les schémas d'administration de type bolus.*

C/ L'incorporation dans l'ADN lui-même par la formation du 5-FdUTP se présentant comme substrat des ADN polymérase à la place de la déoxythymidine triphosphate (dTTP) elle-même déplétée par le blocage de la TYMS.

Enfin l'intégration dans les membranes cellulaires de sucres nucléotidiques contenant du 5-FU (FUDP-hexoses, FUDP-hexosamines, FUDP-N-acétyl-hexosamines) pourrait aboutir également à des altérations à ce niveau et à des troubles de la glycosylation.

1.2. Toxicités dues au 5-Fluorouracile.

Le profil de toxicité du 5-FU dépend du mode d'administration (en bolus ou en perfusion continue) [55], de la durée d'exposition et des variabilités individuelles notamment dans le cas de déficits plus ou moins complets de l'activité de la dihydropyrimidine déshydrogénase.

Cette toxicité est principalement digestive, dose dépendante et limitante, à type de nausées-vomissements immédiats (30 à 60%) prévenus par une prémédication adéquate, et de diarrhées exsudatives voire hémorragiques (9% de grade III-IV en moyenne) aggravées par l'association avec l'acide folinique, ou l'interféron et les perfusions longues. C'est également le cas des atteintes des muqueuses (mucite, gingivite) prévenues par bains de bouche antiseptiques.

La toxicité hématologique (leuconéutropénie et thrombopénie) est plus fréquente dans le cas des traitements de type bolus.

Il existe par ailleurs *une toxicité cutanée* dont le profil clinique va de la photosensibilisation à la toxidermie et plus fréquemment, dans le cas de perfusions continues, à une érythrodermie palmo-plantaire appelée " Syndrome Main-Pieds " (SMP).

Une *irritation conjonctivale* (larmolement, conjonctivite, kératite) liée à un syndrome sec oculaire peut se rencontrer, plutôt dans les schémas en perfusion.

Enfin, il existe *un risque de toxicité cardiaque*, aggravé par les traitements haute dose et l'association avec le cisplatine [56], dont la fréquence est proche de 10%. Cette toxicité est à type de spasmes coronaires mimant un angor, aboutissant cependant rarement à un véritable infarctus du myocarde, ou exceptionnellement à type de sidération myocardique par toxicité directe (myocardite toxique) : Le tableau clinique est alors celui d'un choc cardiogénique aigu engageant le pronostic vital. Un bilan cardiologique préthérapeutique s'impose donc devant tout patient âgé et/ou à risques cardio-vasculaires.

Il n'existe pas de traitement préventif et le traitement curateur, outre les mesures symptomatiques, se résume à l'arrêt immédiat de la perfusion de 5-FU.

Les autres toxicités multi-viscérales avec défaillance grave éventuelle, dont l'atteinte neurologique (ataxie cérébelleuse, leuco-encéphalite) se rencontrent essentiellement en cas de toxicité sévère, dominée par les cas de déficit majeur de l'activité enzymatique de la DPYD [57].

2. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD).

Son gène est localisé sur le chromosome 1p22 et comporte 23 exons. L'activité enzymatique de la DPYD est soumise à un polymorphisme génétique [58], et présente une grande variabilité d'expression interindividuelle qui se répartit selon une courbe gaussienne dans la population générale [59]. L'altération des fonctions hépatiques n'est pas impliquée [60], pas plus que l'âge ou l'origine ethnique [61]. Il existe des résultats discordants quant au sexe.

La protéine DPYD est constituée de 2 sous-unités identiques (homodimère), de 1025 acides aminés chacune, et comporte plusieurs motifs structuraux fonctionnels. Les bases pyrimidiques (thymine et uracile) sont ses substrats naturels avec une affinité supérieure pour le 5-FU. Une trentaine de mutations ponctuelles ont été individualisées jusqu'à présent, dont une quinzaine induisant une baisse d'activité enzymatique soit par dérèglement transcriptionnel (mutations dans la région promotrice) soit et plus fréquemment par la synthèse d'une protéine mutée au niveau des sites impliqués dans son activité (**Figures 12.1 et 12.2**). La fréquence de ces déficits dans la population est estimée à 3% pour les partiels et 0,2% pour les complets.

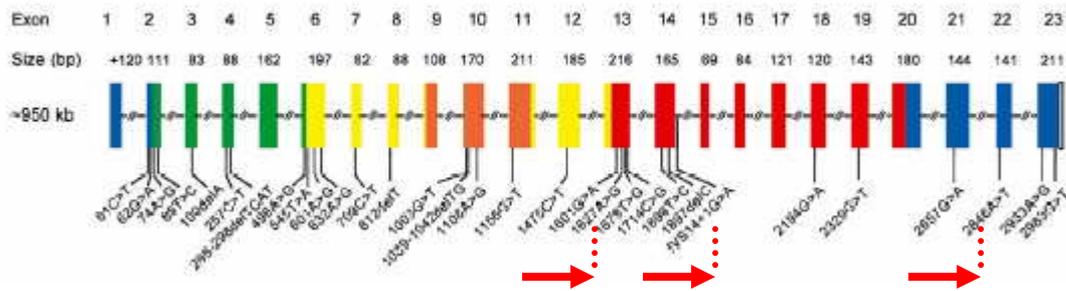


Figure 12.1. Organisation du gène de la DPYD. Les différentes couleurs représentent les régions codantes pour les cinq domaines distinctifs retrouvés au niveau de la protéine: Vert pour le domaine I (N-Terminal contenant 2 sites [4Fe-4S] servant aux réactions d'oxydo-réduction), jaune pour le domaine II (domaine de liaison au dinucléotide flavine-adénine [FAD]), orange pour le domaine III (domaine de liaison au dinucléotide nicotinamide-adénine réduit [NADPH]), rouge pour le domaine IV (liaison au résidu mononucléotide flavine [FMN] et pyrimidine), et bleu pour le domaine V (C-Terminal contenant 2 sites[4Fe-4S]). Les principales mutations connues sont indiquées et trois d'entre elles étudiées ici indiquées par les flèches rouges.

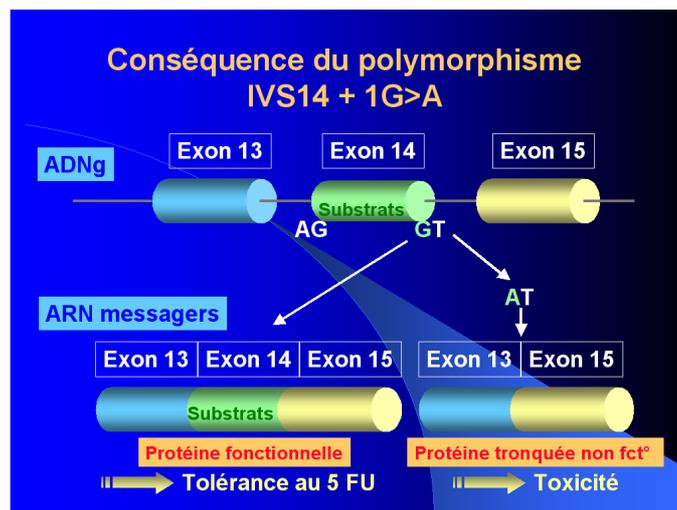


Figure 12.2. Exemple de retentissement fonctionnel d'une mutation de la DPYD.

L'activité enzymatique est corrélée avec la toxicité prévisible au 5-FU notamment en cas de déficit majeur. La technique radioenzymologique de quantification dans les lymphocytes circulants reste la référence [62] mais est inapplicable en pratique courante. D'autres approches sont développées au Centre Paul Papin associant :

- Un dépistage génétique par pyroséquençage des mutations les plus fréquentes dans la population caucasienne : IVS 14 + 1G>A, au niveau de la région codant pour le site de fixation du substrat, 1679 T>G au niveau de la région codant pour le site de fixation au FAD, 2846 A>T interférant avec la fixation du cofacteur et le transport d'électrons et enfin 464 T>A, mutation non-sens.

- Au rapport plasmatique UH2/U (l'uracile étant l'un des substrats naturels de la DPYD et UH2 son métabolite), plus adapté à des techniques de routine en laboratoire et mieux corrélé à la clairance plasmatique du 5FU.

Ces méthodes permettent ainsi de dépister les patients déficitaires tout en offrant la possibilité d'avoir une idée pré-thérapeutique de la dose optimale visée chez le patient [63].

3. La thymidylate synthase (TYMS).

3.1. La thymidylate synthase est une cible privilégiée dans la stratégie antitumorale.

Elle constitue en effet la seule voie de synthèse de la thymidine, précurseur nucléotidique spécifique de l'ADN, indispensable à sa réplication et aux mécanismes de réparation.

La TYMS est ainsi responsable de la transformation par méthylation de la déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythymidine monophosphate (dTMP), le méthylènetétrahydrofolate (CH₂THF) ayant le rôle de cosubstrat en tant que donneur de méthyle. Le dTMP est ensuite phosphorylé en déoxythymidine di- puis tri-phosphate (dTTP), lequel est incorporé dans l'ADN par des enzymes polymérase.

Le 5-FdUMP, métabolite actif du 5 FU, agit donc comme un inhibiteur compétitif d'affinité plus grande cependant que le substrat naturel dUMP, et formant avec la molécule de TYMS et le méthylènetétrahydrofolate un complexe ternaire stable, le transfert de méthyle étant rendu impossible par la présence de l'atome de fluor en position 5 qui ne peut être déplacé à la différence de l'atome d'hydrogène.

Le gène de la TYMS est situé sur le chromosome 18, a une longueur de 18 kilo paires de bases et est constitué de sept exons et six introns [64]. La région promotrice et les principaux sites initiateurs de la transcription sont respectivement localisés à environ 400 paires de bases (pb) et 180 pb en amont du codon initiateur ATG.

Compte tenu de son rôle privilégié dans la synthèse et la réparation de l'ADN, la TYMS a fait l'objet de nombreuses recherches dont les principaux résultats peuvent être résumés comme suit.

3.2. L'état des connaissances sur la thymidylate synthase.

- La sensibilité *in vitro* au 5-FU de lignées cellulaires de cancers colo-rectaux est inversement corrélée au taux de TYMS et à son niveau d'expression [65-66].

- Un des mécanismes de résistance innée ou acquise au 5-FU est l'hyperexpression de la TYMS [67].
- *In vivo*, la surexpression du gène de la TYMS représenterait un facteur prédictif de mauvaise réponse au traitement par 5-FU [68].
- La protéine TYMS, qui possède des sites de liaison aux acides nucléiques, joue un rôle de régulation sur son propre ARN messager -ainsi que sur les ARNm de p53 et c-myc entre autres lui conférant donc une action large au sein de la cellule- par un phénomène de rétrocontrôle négatif selon qu'elle est ou non liée à ses substrats [69].
- Il a été mis en évidence un certain nombre de polymorphisme au sein du gène de la TYMS dont les conséquences sur l'activité enzymatique passeraient par des niveaux de régulation transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Ainsi à ce jour, trois polymorphismes ont été individualisés :

3.2.1. Au niveau de la région promotrice (Thymidylate Synthase Enhancer Region ou TSER) - qui ne possède pas de TATA Box à l'instar de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire- ainsi qu'au niveau de la région 3' non traduite de l'ARNm (3'UTR), il a été décrit un polymorphisme de répétition d'une séquence de 28 paires de bases appelée " R " pour " Répétition ". Cette variation du nombre de séquences " R " de 2 à 9 (le plus grand nombre étant observé dans les populations d'origine africaine) [70] pour chacun des allèles a permis d'individualiser des groupes de patients: Soit homozygotes 2R/2R, et 3R/3R, soit hétérozygote 2R/3R pour les plus fréquentes dans les populations non africaines (**Tableau VI**).

Tableau VI. Génotype de la région promotrice et fréquence de l'allèle chez les sujets caucasiens, du Sud-Est Asiatique, et chinois. D'après Marsh. Genomics 58, 310-312 (1999).

Ethnic Group	n	Genotype			Allele frequency	
		2/2	2/3	3/3	2	3
Caucasian	96	19 %	43 %	38 %	0.40	0.60
Southwest Asian	95	16 %	44 %	40 %	0.38	0.62
Chinese	96	2 %	31 %	67 %	0.18	0.82
Japanese	21	n/a	N/a	n/a	0.19	0.81

In vitro, les études ont montré que l'activité transcriptionnelle du promoteur comprenant trois séquences de répétition est augmentée par rapport à celle du promoteur en contenant deux [71]. Les travaux de Kawakami *et al.* ont également montré qu'il existe une augmentation de l'efficacité traductionnelle (3 à 4 fois plus) de l'ARNm avec trois séquences " R " [72].

In vivo, les données cherchant une corrélation entre ces séquences de répétition et la réponse observée au traitement par 5-FU sont très variables dans leur méthodologie (étude du génome tumoral ou non, de l'ARNm, de l'activité enzymatique, cohortes de faibles effectifs, modalités différentes de traitement associant parfois d'autres cytotoxiques dont la cible n'est pas la TYMS, cancers de type et de stade variés...) et dans leurs résultats souvent contradictoires [73-75].

3.2.2. Un polymorphisme nucléotidique (G>C) surajouté et situé dans la deuxième région de répétition de l'allèle 3R a été individualisé il y a environ 7 ans.

In vitro, des études utilisant différents plasmides de transfection ont ainsi pu montrer, dans le cas d'une séquence sauvage " 3G " (la plus fréquente dans la population caucasienne, environ 56%) une meilleure efficacité de la traduction [76] comme de la transcription [77]. Pour cette dernière, la modulation serait liée à l'abolition d'un site de fixation pour un facteur transcriptionnel USF-1 dans le cas de la mutation " 3C " (**Figure 13 ci-dessous**). L'existence de cette mutation surajoutée pourrait rendre compte des résultats contradictoires soulignés plus haut, et son individualisation permettre, couplée au polymorphisme de répétition et au vu des études de transfection, de redéfinir la distribution des patients selon une expression prédictive de la TYMS dite " haute " ou " basse " sur des critères purement génétiques. Une nouvelle répartition a ainsi été proposée par l'équipe de Kawakami en 2003 [76] détaillée dans le **tableau VII**.



Figure 3. Séquences de répétition de 28 pb au sein de la région promotrice du gène de la TS. Le site de fixation E-Box pour le facteur de transcription USF-1 est souligné (d'après Mandola *et al.*).

Tableau VII. Expression prévisible de la TYMS selon la combinaison de la mutation C>G et du polymorphisme.

« Haute » expression	« Basse » expression
2R / 2R	2R / 3Rg
2R / 3Rc	3Rc / 3Rg
3R / 3Rc	3Rg / 3Rg

In vivo, deux études rétrospectives, étudiant l'ADN tumoral pour la première (258 patients) et l'ADN germlinal sur leucocytes circulants pour la seconde (89 patients), ont retrouvé une corrélation statistiquement significative entre cette distribution et la survie globale de patients porteurs de cancers colo-rectaux traités par 5 FU avec un avantage pour les groupes à expression " basse " [76,78].

3.2.3. Enfin il existe un dernier polymorphisme à type d'insertion-délétion de 6 paires de bases située 477 pb après le codon " Stop ". L'allèle portant la délétion est présent chez 27 % des caucasiens, avec de grandes variations inter-ethniques, et est associé à une diminution de stabilité de l'ARNm TYMS *in vitro* ainsi qu'à une baisse de l'expression de la TYMS intratumoral *in vivo* [79].

4. La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR).

Elle tient un rôle essentiel dans le cycle des folates et la synthèse du S-Adénosylméthionine (SAM), donneur cellulaire universel du groupement méthyle en convertissant de façon irréversible le 5-10 méthylène tétrahydrofolate (CH₂FH₄) en 5-méthyltétrahydrofolate (CH₃FH₄). Elle se situe donc à l'interface entre la voie de synthèse de la thymidine et celle de la méthionine, indispensable à la synthèse protéique, au cycle cellulaire et à la méthylation de l'ADN (Figure 14).

La modulation de l'efficacité du 5-FU par l'acide folinique, précurseur du CH₂FH₄, par stabilisation du complexe ternaire formé avec la TYMS, a été clairement démontrée [48].

Le rôle clé de la MTHFR dans la concentration intracellulaire de folates explique l'attention portée sur cette enzyme comme cible de recherche pour l'optimisation des traitements par le fluorouracile.

Son gène est localisé en 1p36.3 et comporte 11 exons. Sa région promotrice ne comprend pas de TATA Box mais de nombreux îlots CpG, comme pour la TYMS, et de multiples sites de liaisons avec SP1 transactivateur ubiquitaire. 44 mutations ont été répertoriées en 2004 dont 37 induisant un déficit enzymatique sévère (inférieur à 20% de la normale) associé à une hyperhomocystéinémie, des thromboses, des anomalies neurologiques et une prédisposition au cancer par hypométhylation de l'ADN. Les deux mutations les plus fréquentes (environ 15% et 12% respectivement pour les homozygotes dans la population caucasienne) et les plus étudiées sont les polymorphismes nucléotidiques 677 C>T (diminution de 75% de l'activité pour les homozygotes) et 1298 A>C (diminution de 30%).

In vitro, des études relativement récentes ont fait la preuve du concept de la majoration des effets des fluoropyrimidines en cas de génotype MTHFR muté [80].

In vivo, peu d'études et sur de faibles effectifs ont évalué ce lien [81-84].

Néanmoins, ces différents travaux ont montré des réponses au traitement par 5-FU pour la plupart significativement différentes en fonction du polymorphisme de la MTHFR, essentiellement pour la mutation 677 C>T avec un bénéfice observé dans ce cas. Par contre, en dehors de l'étude chinoise de Lu *et al.* concernant des patients porteurs d'un cancer de l'estomac, il n'a pas été mis en évidence de différence en terme de toxicités [85].

Les données sur les survies sans progression et les survies globales sont encore plus fragmentaires. Il n'a pas été rapporté de différence significative sur ce point selon le polymorphisme 677 C>T, mais les travaux de Etienne *et al.* observent paradoxalement une survie écourtée dans le cas des homozygotes mutés en 1298 [82]. Un résultat possiblement en rapport avec une croissance tumorale plus rapide du fait d'une synthèse de thymidine plus efficace et/ou du fait de phénomènes d'hypométhylation de l'ADN.

Enfin, la recherche de corrélation entre les principaux polymorphismes des enzymes impliquées dans le métabolisme du 5-FU et les toxicités ou efficacités observées dans le cadre d'un traitement de type LV5FU2 (Leucovorine et 5-FU en perfusion), fait l'objet de la publication N°1 présenté dans le cadre de notre Thèse d'Université.

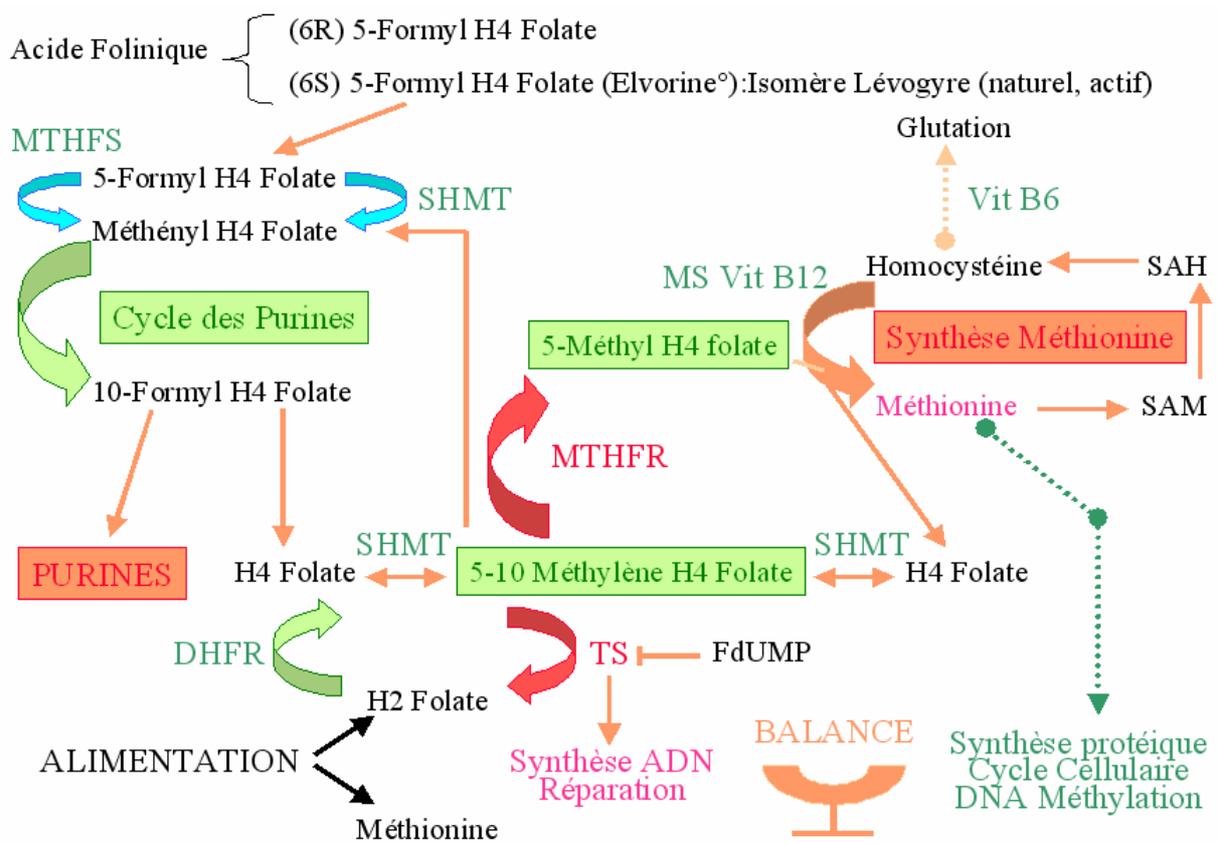
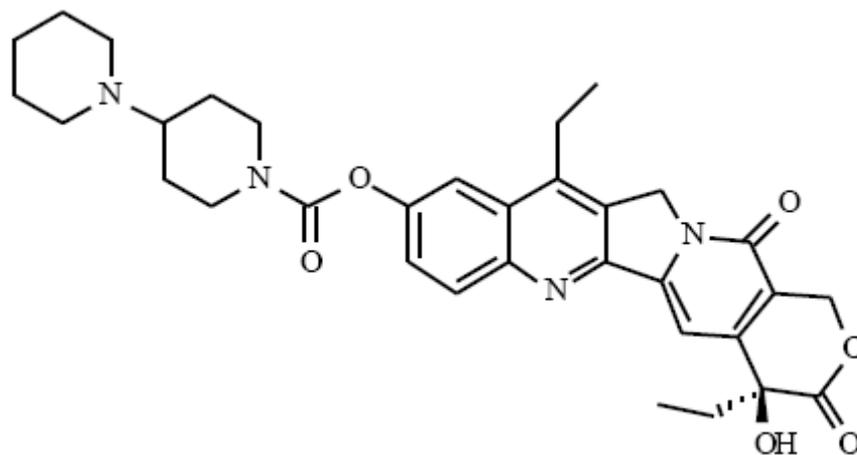


Figure 14. Balance entre les voies de synthèse de la méthionine et de la thymidine.

**II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA
PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX
CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE**

4. PHARMACOLOGIE DE L'IRINOTECAN (CPT-11)



1. Présentation.

Les inhibiteurs de topoisomérase I font parties d'une classe d'agents cytotoxiques parmi les plus prometteuses développées ces dernières années. Leur découverte n'est cependant pas récente : Le programme de « screening » de l'Institut National du Cancer américain (NCI) identifia dès les années 50 que les extraits de l'arbre chinois *Camptothecia Acuminata* avaient un effet cytotoxique sur des lignées de cancer humain.

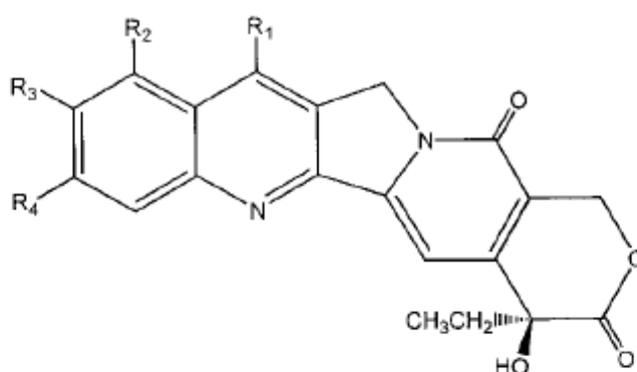
En 1966, Monroe Wall *et al.* identifia le principe actif à partir de ces extraits végétaux, la camptothécine [86]. Des expériences de pharmacologie cellulaire sur lignée ont permis d'observer dans les années 70 que la camptothécine induisait des lésions d'ADN, ainsi qu'une inhibition de synthèse des ARNm et de l'ADN avec mort cellulaire [87]. En raison de l'insolubilité en solution aqueuse de la camptothécine, c'est le sel de sodium de camptothécine qui fut testé en phase I et II précoces au début des années 1970 : quelques réponses furent observées dans les cancers colorectaux, gastriques et pulmonaires mais la survenue de cystites hémorragiques stoppa à l'époque le développement de la molécule [88-89].

Finalement ce n'est qu'en 1985 que l'enzyme nucléaire topoisomérase I a été formellement identifiée comme sa cible moléculaire, relançant l'intérêt de la camptothécine, comme de ses dérivés, au vu donc de son mécanisme d'action tout à fait donc original par rapport à d'autres cytotoxiques : le ciblage de la Topoisomérase I. Des dérivés plus hydrosolubles et moins toxiques furent alors développés en clinique, en particulier l'irinotecan (CPT-11) et le topotecan (**Figure 16**).

L'irinotecan (Campto, Pfizer), est le 7-éthyl-10-[4]-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxy-camptothécine. C'est un inhibiteur de topoisomérase I mais c'est surtout la prodrogue d'un inhibiteur de 300 à 1000 fois plus actif, le SN-38 ou 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine, obtenu après action d'une enzyme carboxyestérase en C10, et conduisant à la perte du radical bispiperidino. Le SN-38 est le plus puissant des poisons de topoisomérase I *in vitro* [90].

Ainsi les effets pharmacodynamiques de l'irinotecan qu'il s'agisse de l'activité antitumorale comme des effets secondaires sont directement liés aux concentrations circulantes de SN-38. L'irinotecan fut le premier dérivé hydrosoluble de camptothécine à entrer en essai clinique au Japon dans les années 80. Il fut par la suite commercialisé pour le traitement des cancers

colorectaux métastatiques résistants au 5-FU, suite à deux essais cliniques en 2^e ligne de traitement, l'un comparant l'irinotecan versus soins de support [91] et l'autre versus une seconde modalité de 5-FU [92]: dans les deux cas, les taux de réponse n'étaient pas majeurs en gain mais le bénéfice en survie sans progression était par contre évident : l'irinotecan induisait donc un impact plus fort en terme de paramètre lié au temps qu'en terme de volume tumoral lysé. Il a été enregistré en première ligne dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, en association avec le 5-FU [93], puis avec le bevacizumab [94] ; enfin les données de l'étude CRYSTAL démontrent son efficacité combinée avec le cetuximab en première ligne métastatique [95].



Compound	Molecular weight	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Camptothecin	348.36	-H	-H	-H	-H
Topotecan	421.46 ^a	-H	-CH ₂ N(CH ₃) ₂	-OH	-H
Irinotecan	586.69 ^a	-CH ₂ CH ₃	-H		-H
SN-38	392.42	-CH ₂ CH ₃	-H	-OH	-H
9-Aminocamptothecin	363.38	-H	-NH ₂	-H	-H
9-Nitrocamptothecin	393.36	-H	-NO ₂	-H	-H
GI-147211	518.57 ^a		-H	-OCH ₂ CH ₂ O-	-H
Exatecan	435.46 ^a		-H	-CH ₃	-F
Karenitecin	448.60	-H	-CH ₂ CH ₂ Si(CH ₃) ₃	-H	-H

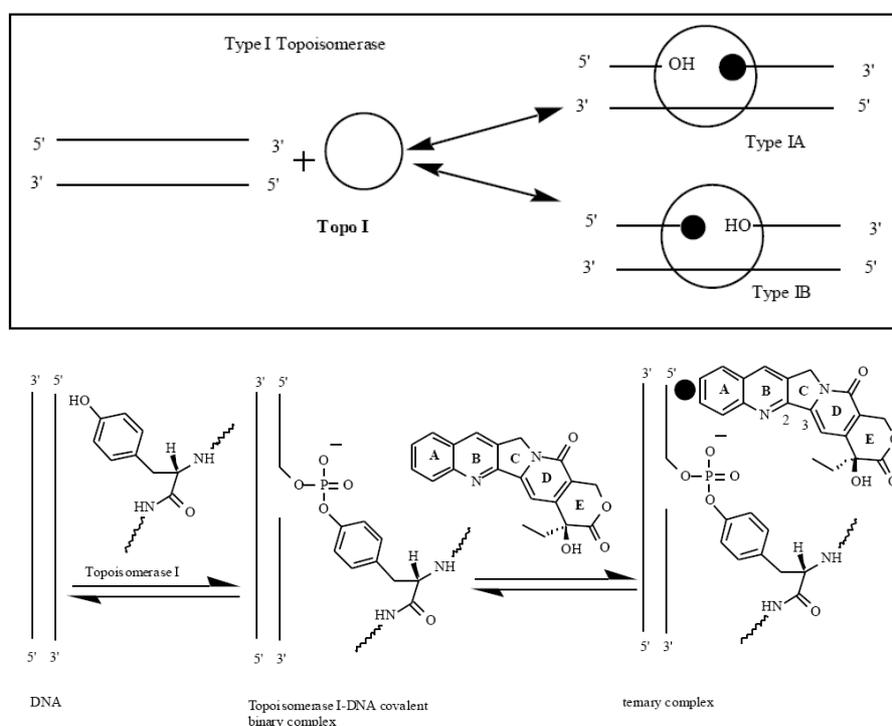
^a Free base.

Figure 16. Camptothécine et dérivés.

Le développement clinique de l'irinotecan fut remarquable avec très clairement une relation majeure entre la dose-intensité et l'effet thérapeutique. Cependant l'intensification de dose se heurta à l'écueil de deux toxicité limitantes : une toxicité habituellement rencontrée avec les cytotoxiques « classiques », la neutropénie, et une toxicité plutôt inhabituelle, l'apparition d'une diarrhée aigue tardive de type cholériforme, pouvant conduire à des états de déshydratation sévère avec nécessité d'hospitalisation. Face à cette dernière, l'apprentissage clinique d'une prise en charge adéquate par un traitement antidiarrhéique (loperamide) à forte dose et à débiter dès les premiers symptômes permit un meilleur contrôle de cet effet secondaire [96]. Parallèlement le développement d'autres schémas de traitements aboutissant à un meilleur rapport efficacité-tolérance a fait privilégier, en France en tout cas, des protocoles toutes les deux semaines à 180 mg/m² pour l'irinotecan (protocole FOLFIRI en combinaison avec le 5-FU) [97-98].

2. Pharmacologie de l'Irinotecan (CPT-11).

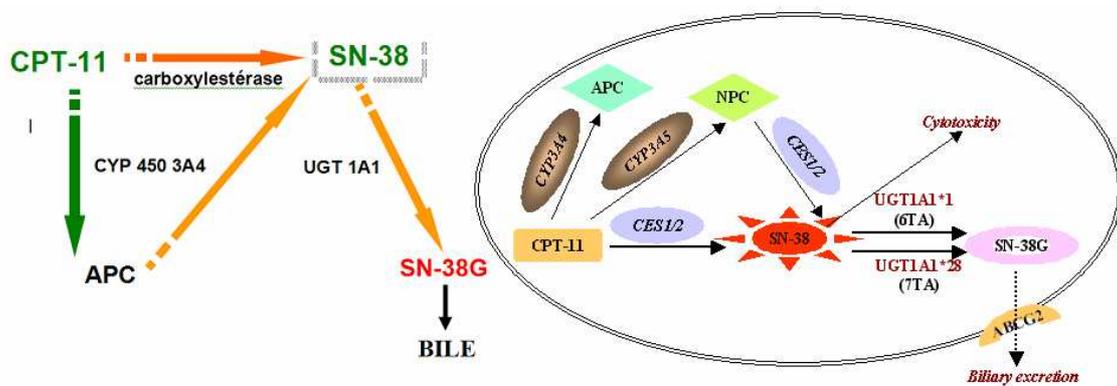
L'irinotecan est donc un dérivé héli-synthétique de la camptothécine, qui inhibe spécifiquement la topoisomérase I, induisant des lésions simple brin de l'ADN bloquant la fourche de réplication (**Figures 17.1 et 17.2**). Son activité cytotoxique est conditionnée par le temps de contact avec les cellules, et semble spécifique de la phase S [99-100].



Figures 17. 17.1. Mécanisme d'action de la Topoisomérase I sur l'ADN.

17.2. Interaction ADN/Topoisomerase I/Irinotecan: Complexe ternaire stable.

Le CPT-11 est principalement métabolisé par les carboxylestérases en un métabolite actif : le SN-38, de bien plus grande affinité pour la Topoisomérase I purifiée, et plus cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires tumorales [101]. Le SN-38 est lui-même inactivé par glucuroconjugaison via l'uridine diphosphoglucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1). Le SN-38 (glucuronidé) est par la suite hydrolysé dans l'intestin. A ce niveau, une partie est cependant retransformée en SN-38 sous l'action de β glucuronidases bactériennes digestives contribuant à la survenue du tableau diarrhéique aigu retardé. Enfin, le CPT-11 est oxydé par les cytochrome P450 CYP3A4 et CYP3A5 en métabolites inactifs : APC et NPC (Figures 18.1 et 18.2).



Figures 18.1 et 18.2 Métabolisme de l'Irinotecan.

Irinotecan est une prodrogue requérant une activation métabolique par les carboxylestérases en son métabolite actif, le SN-38. L'Irinotecan est lui-même métabolisé par les cytochromes hépatiques P450 3A4 (et 3A5) en 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (APC), qui a une activité antitumorale 500 fois moindre par rapport au SN-38. Le SN-38 est détoxifié par glucuronidation via l'uridine diphosphoglucuronosyltransférases 1A1 (UGT 1A1) en SN-38 glucuronidé (SN-38G) puis éliminé dans les selles par voie biliaire.

Le CPT-11 inchangé est l'entité principale dans le plasma, suivi par l'APC, le SN-38 glycuconjugué et le SN-38. Les essais de phase I (100-750 mg/m² IV en 30 minutes) ont montré une pharmacocinétique triphasique, avec une demi-vie plasmatique terminale de 14,2 heures. Le SN-38 a montré un profil d'élimination biphasique avec une demi-vie d'élimination terminale moyenne de 13,8 heures [100-101]. Une large variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques était observée, notamment pour le SN-38. L'exposition au CPT-11 et au SN-38 augmente proportionnellement avec la dose administrée. La pharmacocinétique semble indépendante du nombre de cycles administrés et du schéma d'utilisation [100].

Une des voies d'élimination majeure est fécale, via les sels biliaires, avec environ 33% de la dose d'irinotecan administrée retrouvée dans les selles [99]. La sécrétion biliaire se fait par l'intermédiaire de deux types de transporteurs : les transporteurs canaliculaires de la bilirubine et des anions organiques (cMOAT), ainsi que les transporteurs d'efflux aux xénobiotiques dont la P-glycoprotéine (Pgp), mais également ABCG2, et dont les activités sont réduites lors d'une obstruction biliaire, de phénomènes inflammatoires et septiques [102-103]. L'autre voie d'élimination est biliaire, avec près de 50% de la dose administrée retrouvée dans les urines.

On l'a vu, les principales toxicités de l'irinotecan sont hématologiques et digestives. La toxicité digestive est principalement attribuée au SN-38 et à l'exposition secondaire endoluminale dans le tube digestif [104-105]. La toxicité hématologique est corrélée à l'aire sous la courbe de l'irinotecan et du SN-38 [106].

La clairance de l'irinotecan est diminuée d'environ 40% chez les patients ayant une bilirubinémie comprise entre 1,5 N et 3N. Chez ces patients, la posologie de 200 mg/m² d'irinotecan entraîne une exposition comparable à celle observée chez les patients ayant des paramètres hépatiques normaux et recevant 350 mg/m². Lors d'administrations hebdomadaires, le risque de manifestations d'effets toxiques hématologiques de grade 3-4 au premier cycle, comme la neutropénie, a été plus élevé chez les patients dont la bilirubinémie totale de départ était légèrement élevée (de 17 à 35 micromol/L) que ceux dont la bilirubinémie était inférieure à 17 micromol/L [107]. Des taux élevés de bilirubinémie et de phosphatases alcalines sont étroitement corrélés à une diminution de la clairance de l'irinotecan, principalement par excrétion biliaire, avec augmentation consécutive des taux de SN-38 [107] : Il est donc recommandé pour des administrations tous les 21 jours, des posologies de 200 mg/m² chez les patients présentant une bilirubinémie de 1,5 à 3 N, et de 300 mg/m² lorsque la bilirubinémie n'excède pas 1,5N. Les recommandations du fabricant sont de déconseiller l'administration d'irinotecan chez les patients avec bilirubinémie > 35 micromol/L, des transaminases > 3N en l'absence de métastases hépatiques, et de 3N en présence de celles-ci [108]. Par ailleurs, l'irinotecan est modérément lié aux protéines plasmatiques (30-60%) mais son métabolite actif, le SN-38, y est lié à près de 95% [24] : une prudence toute particulière doit donc être conseillée chez les patients présentant une hypoalbuminémie du fait d'un état de dénutrition, d'une insuffisance hépatocellulaire (tare sous-jacente, envahissement métastatique), d'une rétention hydrosodée (augmentation du volume de distribution), de pertes rénales (glomérulopathies voire syndrome néphrotique), d'un hypercatabolisme (syndrome infectieux) [109]. On notera que le CPT-11 administré en

IV chez un patient porteur d'un drain biliaire externe (donc sans exposition endoluminale) était éliminé plus lentement que chez des sujets sains, avec une toxicité essentiellement hématologique [109].

Enfin, les études pharmacocinétiques de population n'ont pas montré de corrélation entre la clairance de l'irinotecan et les caractéristiques démographiques tels que le poids, la taille, le sexe, l'ethnie, et la fonction rénale (notamment la clairance de la créatinémie calculée par la formule de Cockcroft) [110]. A noter cependant que chez le patient fumeur, l'aire sous la courbe s'est révélée plus basse que chez le non-fumeur [111], avec une exposition diminuée de plus de 40% au SN-38 : la toxicité hématologique était considérablement réduite dans cette population avec seulement 6% de neutropénies sévères (grade 3-4), contre 38% chez les non fumeurs (OR :0,10 ;IC95% :0,02-0,43 ; p < 0,001); la toxicité digestive était par contre comparable dans les deux groupes. Le mécanisme pourrait correspondre à l'activation des cytochromes P450 (dont le CYP1A2 et à moindre titre le CYP3A4) par les dérivés aromatiques polycycliques contenus dans la fumée de tabac. En tout cas, une telle donnée est à prendre en considération dès lors que l'on recherche des niveaux de corrélations entre certains polymorphismes impliqués dans le métabolisme de l'irinotecan et les toxicités observées (risque de biais statistiques en analyse uni- comme en multivariée majeurs).

Autres risques importants de biais statistiques : les interactions médicamenteuses possibles, notamment avec les inhibiteurs (kétoconazole, par exemple...) ou inducteurs (rifampicine, carbamazépine, phénytoïne, phénobarbital,...) du cytochrome CYP3A4 [108]. Avec le kétoconazole par exemple, il est observé une diminution de 87% de l'AUC de l'APC et une élévation de 109% de l'AUC du SN-38 [112]. Il n'est pas rapporté de modification pharmacocinétiques par contre avec l'association au 5-FU/acide folinique [108].

Enfin les principales caractéristiques pharmacocinétiques de l'irinotecan et de ses dérivés sont résumées dans le **Tableau VIII**, ci-après.

Dans le domaine de la pharmacogénétique, les efforts se sont focalisés ces dernières années sur les polymorphismes de l'UGT 1A1 dans la population générale, et les retentissements éventuels qui peuvent en découler en terme de gestion des toxicités ou d'optimisation thérapeutique avec éventuelle intensification de doses selon la population étudiée. *C'est également l'objet d'un de nos travaux présentés ici (voir DEUXIEME PARTIE ; publication n°2).*

Table 1 Pharmacokinetic parameters of the camptothecins in adult cancer patients with solid tumors^a

Compound	Administration	Chemical form assayed	C _{max} (D) ^b (nM)	CL (liter/h/m ²)	V _{ss} (liter/m ²)	t _{1/2,z} (h)	AUC ratio (L:T)	Urinary excretion (%)	Oral bioavailability (%)	Ref.
Camptothecin sodium	Bohus i.v.	T	21,300 (20)	0.34	7.0	15.3	NR ^c	16.5		3, 4
Topotecan	30 min i.v.	L	78 (1.5)	27.4	75.4	2.8	0.37			64–66
		T	142 (1.5)	13.4	68.6	4.1		30.2		64, 72
	24 h ci	L	5.8 (1.5)	27.5	92.0	4.1	0.33			67–69
		T	10.7 (1.5)	14.4	NR	3.5		50.0		67
	21 d ci	L	1.5 (0.6)	40.2	NR	NR	0.33			70, 71
		T	4.2 (0.6)	13.1	NR	NR		40.0		70, 71
Irinotecan	90 min i.v.	L	12.8 (1.5)			2.4	0.33		30	66
		T	975 (150)	53.5	NR	5.7	0.44			115, 116
	96 h ci	L	2,304 (150)	17.0	142.0	7.3		25.7		115, 116, 119
		T	28.6 (10)	24.9	NR	NR	NR	NR		120
	p.o.	L	78.9 (66)	262.0 ^d		11.4	0.39		8	117, 118
		T	33.4 (150)			11.5	0.51			115, 116
SN-38 ^e	90 min i.v.	L	93.5 (150)			10.2		0.26		115, 116, 119
		T	6.4 (10)			NR	NR	NR		120
	96 h ci	L	18.4 (66)			16.9	0.75			117
		T	2.6 (2.5)	27.4	259.8	16.8	0.09			154, 158
	p.o.	L	59.1 (2.5)	2.0	23.6	8.4 ^f		32.1		159
		T	12.7 (0.84)			9.72	0.08		49	160, 161
9-AC	72 h ci	L	116 (1.5)			NR		NR	63	161
		T	35 (1.5)			NR	0.11			171–174
	p.o.	L	432 (1.5)			14.4		5.0	NR	171–174
		T	25.6 (1.5)	65.5	311	5.6	0.27			177–178
	72 h ci	L	96.5 (1.5)	21.0	149	9.6		11.0		177
		T	2.2 (1.75)	64.4	NR	7.5	NR	11.4		179
GG-211	21 d ci	L	0.7 (0.4)	50.3	NR	NR	NR			180
		T	7.9 (6)			6.8	0.43		11.3	181
	p.o.	L	NR			NR		NR	11.8	181
		T	177 (0.5)	1.8	14.3	7.3	NR	6.10		187, 188
	30 min i.v.	L	144 (2.4)	2.9	8.9	13.9	NR	8.9		191
		T								

^a The information presented in this table represents a comprehensive evaluation of the published data for each compound from single agent clinical studies in adult cancer patients. In cases where pharmacokinetic data was reported for multiple studies of the same administration schedule, data was selected from studies that were considered to be most reliable, based on an assessment of the methodology described in the report and agreement with other published data for the drug. Parameters for which more than one reference has been cited are the average of values from the individual studies.

^b The abbreviations used are: ci, continuous i.v. infusion; C_{max} (D), peak plasma concentration (dose in mg/m²); CL, total plasma clearance; V_{ss}, apparent volume of distribution at steady state; t_{1/2,z}, half-life of the terminal disposition phase; L, intact lactone form of the camptothecin; T, total camptothecin (lactone + carboxylate).

^c NR, parameter was either not reported or could not be estimated from reported data.

^d CL/bioavailable fraction.

^e SN-38 pharmacokinetic parameters obtained after irinotecan administration.

^f Reported value is considered to be unreliable.

Tableau VIII. Paramètres pharmacocinétiques de la camptothécine et de ses dérivés. (D'après Garcia-Carbonero R, et Supko JG. Clin Cancer Res 2002 ; 8 : 641-61.)

3. Adaptation pharmacogénétique et Irinotecan.

L'uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), et dans une moindre mesure l'UGT1A7 et l'UGT1A9 (**voir plus loin**), est donc l'enzyme majeure du catabolisme du SN-38, métabolite actif toxique de l'irinotecan, sa prodrogue. Son inactivation est réalisée par réaction de glucuronidation aboutissant au SN-38 glucuronidé, SN-38G, inactif sur le plan stoechiométrique dans sa liaison avec la topoisomérase I, et atoxique, éliminé par voie biliaire dans les fèces où il sera finalement en partie hydrolysé et en partie retransformé en SN-38 par certaines bactéries du tube digestif.

D'une manière générale, les réactions de glucuroconjugaison, et en particulier celles catalysées par l'UGT1A1, constituent les modifications métaboliques de phase 2 les plus

fréquemment impliquées dans le métabolisme des médicaments (**cf. page 39**). Le métabolite formé, dérivé glucuroconjugué (ou « glucuronidé ») produit de la formation d'une liaison covalente entre le médicament (ou la substance endogène) substrat et l'acide UDP-glucuronique synthétisé par l'organisme à partir du glucose, est beaucoup plus hydrophile que la molécule mère; il ne présentera plus d'activité pharmacodynamique (à la seule exception connue d'un des métabolites glucuroconjugés de la morphine) et pourra être facilement éliminé à la fois au niveau urinaire et dans la bile. Comme pour la plupart des systèmes enzymatiques, il existe plusieurs UDP-glucuronosyl-transférases qui diffèrent les unes des autres par leur séquence peptidique avec pour conséquences une affinité différente de ces isoenzymes pour chacun de leurs substrats.

Deux familles d'UGT ont été caractérisées: UGT1 et UGT2. Contrairement aux autres systèmes comme les cytochromes P450 ou même les isoformes de la famille UGT2 pour lesquels à chaque isoenzyme correspond un gène particulier, l'ensemble des 13 iso-enzymes qui composent la famille UGT1 sont codés par un seul gène, le locus UGT1A situé sur le chromosome 2q37. Ce locus est en effet constitué d'un premier groupe de 13 exons potentiels dont un seul ne sera finalement traduit du fait d'un épissage alternatif (chacun de ces exons constitue l'exon 1 qui diffère d'une isoforme à un autre), puis de 4 autres exons (exons 2 à 5) qui sont communs à toutes les isoformes (**Figure 19**).

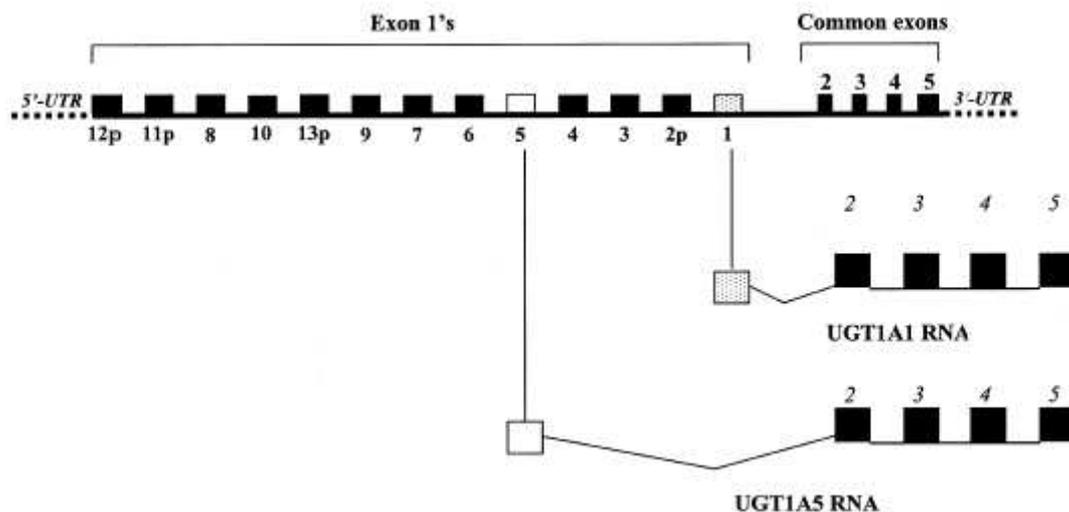
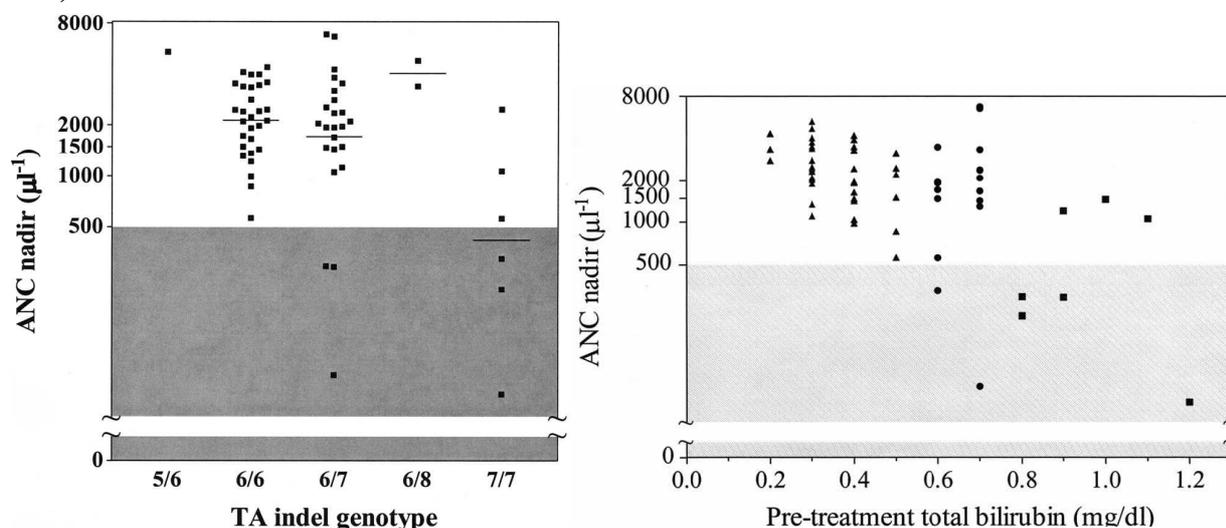


Figure 19. Structure du gène de l'UGT1A correspondant aux gènes codant pour 13 isoenzymes différents, chacun de ces gènes étant composé d'un seul des exons 1 (de 12p à 1) et de 4 exons communs (2-5). Les premiers exons 1 sont épissés de façon alternative en ARN (comme représenté pour les isoformes 1A1 et 1A5). À l'exception des pseudogènes 12p et 13p, tous les exons ont leur propre promoteur. La partie proximale de ces promoteurs contient la boîte TATA (« TATA box ») qui est importante pour la transcription.

Il existe une variabilité interindividuelle de l'activité enzymatique de l'UGT1A1 liée à l'existence d'un polymorphisme correspondant principalement en l'insertion d'un septième doublet de base "TA" (le polymorphisme « sauvage », le plus fréquent, en comportant 6) au sein de la "TATAA box" dans la région 5' promotrice du gène de l'UGT1A1 [113-114]. La fréquence de ce polymorphisme allélique (TA)₆TAA ou UGT1A1*28, dans la population Caucasienne, est de 39% et la fréquence des variants homozygotes (*28/*28, ou 7/7), également connus sous le nom de *Syndrome de Gilbert* (associé à une augmentation de la bilirubine non conjuguée, libre, au niveau sérique), d'environ 10% dans la population générale. Le reste de cette dernière se répartit entre 45% d'homozygotes "sauvages" (*1/*1, ou 6/6) et 45% d'hétérozygotes (*1/*28, ou 6/7).

Il existe des génotypes plus rares (5/6 ou 5/7) avec une activité enzymatique au minimum conservée et des variabilités ethniques importantes [115]. Le caractère homozygote pour le polymorphisme mutant (c'est à dire A(TA)₇TAA pour le génotype de la région promotrice) aboutit à une activité enzymatique équivalente à 30% de celle de la valeur "sauvage", à une augmentation consécutive des taux plasmatiques de SN-38, et donc à un plus grand risque de toxicités sévères, à type de neutropénies et de diarrhées de grade 3-4 [116-119] (Figures 20 et 21).



Figures 20. 20.1. Corrélation entre le taux de polynucléaires neutrophiles (ANC) au nadir (échelle logarithmique) et le génotype de la boîte TATA de l'UGT1A1. Les barres correspondent aux valeurs moyennes. La partie ombrée représente la neutropénie de grade 4. Le patient 7/8 n'a pas été évaluable pour la neutropénie (reproduit d'après Innocenti et al. *J Clin Oncol* 2004).

20.2. Corrélation entre le taux de polynucléaires neutrophiles (ANC) au nadir (échelle logarithmique) et le taux sérique de bilirubine totale avant le traitement. La partie ombrée représente la neutropénie de grade 4. ▲ : taux inférieur à 0,6 mg/dL ; ● : de 0,6 à 0,7 mg/dL ; ■ : supérieur à 0,8 mg/dL.

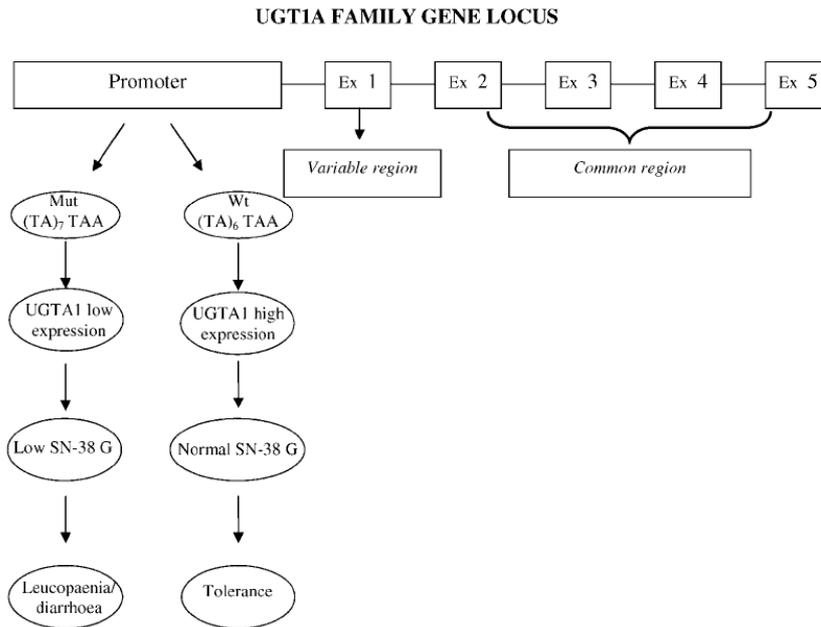


Figure 21. Polymorphismes dans la région promotrice de l'UGT 1A1 et retentissement potentiel sous chimiothérapie par Irinotecan.

Ainsi le génotype de la région promotrice de l'UGT1A1*28 est considéré comme un marqueur pronostique de toxicités chez les patients recevant de l'irinotecan mais sa recherche n'est cependant pas systématiquement réalisée en pratique courante alors même que les dispositions réglementaires aux Etats-Unis, via la "Food and Drug Administration" (FDA), la préconisent, avec conseils donnés de diminuer les posologies dans le cas d'un syndrome de Gilbert avéré.

Une telle incitation n'existe malheureusement pas en France. Ceci dit, même aux Etats-Unis, de telles dispositions focalisant sur la pharmacogénétique, soit le génotypage de l'UGT1A1, avant toute administration de l'irinotecan, sont encore à l'heure actuelle sujets de controverses et finalement peu appliquées dans les faits. Plusieurs raisons peuvent expliquer une telle situation :

- ***L'application en pratique courante concernant les schémas de doses à mettre en œuvre en fonction des résultats génotypiques n'est pas codifiée*** (comme cela peut l'être par exemple concernant l'existence d'une mutation au niveau de Kras et la non indication thérapeutique qui en découle, des anticorps monoclonaux Cetuximab ou Panitumumab; situation finalement « simple ») ; la FDA elle-même, recommande une diminution de posologie sans en préciser le niveau (-20, -30% ?) ni les adaptations éventuelles ultérieures et sur quelles bases (toxicités cliniques ?).

- A ce stade, il est important de considérer que la pharmacogénétique appliquée à l'Oncologie, *ne constitue nullement un simple rendu de résultats génétiques*, mais bien ***un conseil thérapeutique global d'adaptation individuelle*** avec recommandations de diminution (ou d'augmentation le cas échéant) des doses, mais également conseils sur le suivi et la surveillance, quelle soit clinique ou pharmacologique.

- En outre, **l'association entre génotype de l'UGT 1A1 et toxicités hématologiques semblent être influencée par la dose d'irinotecan délivrée [120]**, ce qui constitue des biais statistiques dans l'interprétation des données cliniques (plusieurs schémas de traitements décrits à des posologies très variables). Il existe par ailleurs un manque de preuves formelles (niveau A) dans la littérature que l'adaptation individuelle de doses d'irinotecan, diminuant certes les toxicités, ne compromet pas l'efficacité du traitement.

- **Le génotype homozygote UGT1A1 *28 / *28** (Syndrome de Gilbert) confère une haute susceptibilité de toxicité hématologique aux doses intensifiées d'irinotecan (> 250 mg/m²) ; cependant il **n'explique pas à lui seul la plupart des cas de neutropénies sévères**, et il apparaît clair que d'autres facteurs génétiques ou non, contribuent à ce type de toxicités. Ainsi lors de l'ASCO 2008, ont été rapportés les résultats d'une étude ancillaire de l'essai PETACC 3 comparant FOLFIRI et LV5FU2 en adjuvant après exérèse d'un carcinome colique de stade II ou III [121]: un génotypage de l'UGT1A1 a ainsi été réalisé chez 1405 patients ayant reçu l'irinotecan. Le génotype *28 / *28 a été détecté chez 13% des patients, ce qui correspond à l'incidence habituellement rencontrée du syndrome de Gilbert dans la population générale. Ce génotype homozygote était effectivement associé à davantage de diarrhées et de neutropénies de garde 4 ainsi que de neutropénies fébriles. En analyse multivariée (et en ne tenant compte que du premier cycle de chimiothérapie et du risque de neutropénie fébrile), les facteurs prédictifs indépendants étaient le statut UGT1A1 (RR2,6, p=0,07) mais aussi et surtout le sexe féminin (RR 4,3, p=0,0058). Les facteurs sans valeur prédictive significative étaient la bilirubinémie, l'âge, le performance status et la surface corporelle. Ainsi la valeur prédictive du sexe inciterait à davantage de prudence chez la femme en cas d'escalade de dose de l'irinotecan sans que ne soit exclu que ce facteur prédictif

soit en rapport avec une toxicité liée au 5-FU. On l'a par ailleurs vu, des interactions médicamenteuses (antifongiques par exemple), des facteurs alimentaires (jus de pamplemousse) ou des modes de vie (tabac) peuvent très largement interférer avec l'irinotecan et être causes de toxicités ou de résistance au traitement.

Enfin sur le plan génétique et depuis quelques années, de nombreuses études translationnelles ont cherché à investiguer le rôle sur l'efficacité et les toxicités d'autres polymorphismes au sein de gènes impliqués dans les mécanismes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'irinotecan [122-124]. Ainsi de nombreux SNP (Single Polymorphism Nucleotid) potentiellement responsables d'une altération de l'activité de l'UGT1A1 ont été identifiés, comme par exemple les SNP 3156G>A, 211G>A (allèle UGT1A1*6), 686C>A (UGT1A1*27), 1456T>G (UGT1A1*7), et associés à une diminution *in vitro* de la glucuronoconjugaison du SN-38, ou le SNP 3279T>G (UGT1A1*60) fréquemment retrouvé chez des sujets japonais hyperbilirubinémiques. Cependant, l'impact de chacune de ces dernières mutations sur la glucuronoconjugaison *in vivo* du SN-38 n'est pas clairement établi.

D'autres variants de l'UGT 1A ont également été explorés : le SN-38 sous forme glucuronoconjugué est en partie retransformée en SN-38 sous l'action des β glucuronidases bactériennes contribuant à la survenue des diarrhées tardives liées à l'administration d'irinotecan. Il a ainsi été montré qu'une action antibiotique locale (obtenue par administration orale de néomycine) s'accompagnait d'une moindre toxicité digestive. L'ensemble de ces observations expliquent peut être que la survenue de diarrhées soit corrélée à l'existence de variants non pas de l'UGT1A1, mais de l'UGT1A7, isoenzyme exprimée au niveau digestif mais non au niveau hépatique [125]. Il est possible d'imaginer que la toxicité digestive dépende plus de cette isoenzyme alors que la toxicité systémique implique plutôt l'UGT1A1.

De même, un article récent (Mai 2009) de Cecchin *et al.* [126] dans *Journal of Clinical Oncology*, rapporte des données très intéressantes sur l'intérêt de l'évaluation des polymorphismes de l'UGT 1A7 et 1A9 et qui pourraient être également prédictifs de toxicités et de réponses, seuls ou en association avec le génotypage de l'UGT 1A *28.

D'autres voies et polymorphismes sont également en cours d'exploration : Ainsi par exemple, les gènes des transporteurs ATP Binding Cassette (ABC) dont ABCB1 (codant pour le transporteur MDR1 ou P-glycoprotéine (Pgp), selon la nomenclature utilisée), ABCG2 (MXR ou BCRP) et ABCC2 (MRP2 ou cMOAT) présentent des variations, respectivement, 1236C>T, 421C>A et 156231A>G qui ont été associées à une diminution des fonctions d'efflux des protéines correspondantes. Pour ce qui concerne l'irinotécan et ces protéines de transport, une corrélation entre génotype et phénotype n'a été observée, à ce jour, que pour la mutation en position 1236 de la protéine MDR1 (ABCB1) et la pharmacocinétique du SN-38 [127].

Ces résultats démontrent en tout cas que, plus qu'un simple polymorphisme isolé, c'est la considération d'un ensemble de polymorphismes qui pourraient à l'avenir nous permettre de faire une « cartographie pharmacogénétique » prévisionnelle pour chaque patient.

Enfin, des mutations au niveau de la cible même de l'irinotécan, la Topoisomérase I, ont été identifiées, initialement sur levures [128] mais également et plus récemment au sein du tissu tumoral de patients traités par CPT-11 [129] (Figure 22). Ces mutations pourraient être responsables de mécanismes de résistance au traitement mais la pertinence de leur recherche en pratique courante sur le plan clinique reste encore à démontrer.

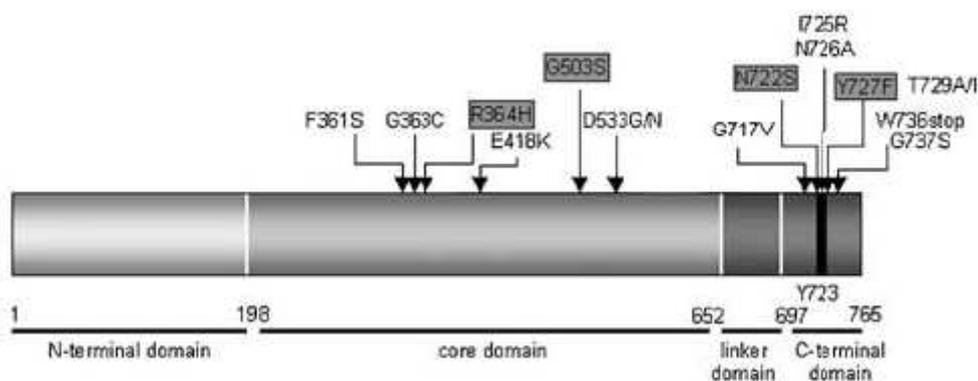
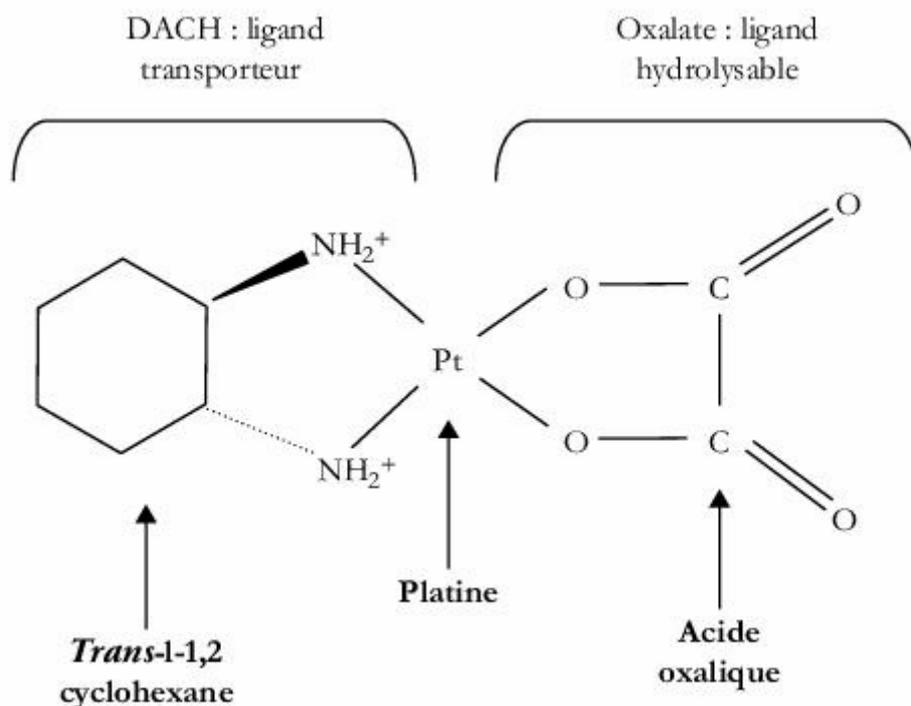


Figure 22. Représentation schématique des principales mutations au niveau de la Topoisomérase I impliquées dans les mécanismes de résistance au CPT-11 (d'après [130]).

II. PRESENTATION DE LA PHARMACOLOGIE ET DE LA PHARMACOGENETIQUE DES PRINCIPAUX CYTOTOXIQUES UTILISES DANS LE CANCER COLORECTAL METASTATIQUE

5. PHARMACOLOGIE DE L'OXALIPLATINE



1. Introduction.

Les dérivés de platine constituent à l'heure actuelle, une classe majeure d'agents anticancéreux. Depuis la découverte du cisplatine et son autorisation de mise sur le marché en 1978, de nombreux composés de platine ont été synthétisés et évalués en tant que cytotoxiques, mais seulement cinq sont actuellement utilisés : le cisplatine et le carboplatine dans le monde entier, l'oxaliplatine dans quelques pays (Europe, Etats-Unis), le nedaplatine au Japon et le lobaplatine en Chine. Si ces molécules partagent la propriété fondamentale de former des adduits sur l'ADN, ils présentent néanmoins des différences tant pharmacocinétiques qu'au niveau de leur spectre antitumoral.

Les dérivés de platine sont des agents alkylants puisqu'ils possèdent un groupement chimique pouvant former des liaisons covalentes ou « adduits » avec les acides nucléiques. Ces adduits vont inhiber la réplication de l'ADN et entraîner la mort cellulaire. Ils sont constitués d'un atome de platine lié à deux ligands, un ligand transporteur et un ligand hydrolysable, variable en fonction du dérivé.

Pour le cisplatine ou cis-diamino-dichloro-platine et le carboplatine, dérivés de première et deuxième génération (**Tableau IX**), les ligands hydrolysables sont respectivement deux atomes de chlore et un cyclobutane dicarboxylate qui, sous l'effet de l'hydrolyse, sont remplacés par des molécules d'eau formant ainsi un composé commun, le cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ou diaquoplatine (**Figure 23**).

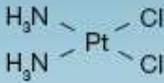
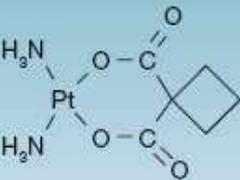
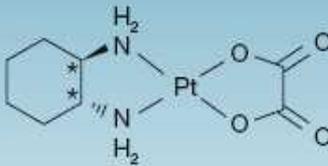
Pour l'oxaliplatine (Eloxatin®), [(1R, 2R)-1,2-cyclohexanediamine-N, N'] [oxalato (2-)-O, O'] platine (II), ou trans-*l*-diaminocyclohexane oxalatoplatine, L-OHP, le ligand transporteur est le diaminocyclohexane (DACH) et le ligand hydrolysable est l'acide oxalique (**Tableau IX**). L'oxaliplatine est activé par la perte du groupement oxalate qui est remplacé par deux ions chlore. L'oxaliplatine est ainsi transformé en DACH-dichloroplatine, métabolite actif.

Ces composés formés par hydrolyse spontanée vont exercer leur cytotoxicité en formant des adduits sur l'ADN, plus particulièrement au niveau de l'atome N7 des bases guanine et adénine. Ces adduits peuvent être monofonctionnels (liés à une seule base) ou bifonctionnels (liés à deux bases) (**Figure 23**). L'analyse de la structure des adduits formés par le cisplatine [131-132] montre que les ponts intrabris guanine-guanine (dGdG) représentent 60 à 65 % du

platine lié avec l'ADN, les ponts adénine-guanine (dAdG) représentent 20 à 25% et les ponts intrabrinns guanine-guanine non adjacentes 5 à 6 %. Les adduits restants sont constitués de diverses liaisons telles que liaisons interbrins et des adduits monofonctionnels. Bien que les adduits formés par le carboplatine soient identiques, leur cytotoxicité est plus faible que celle du cisplatine car l'hydrolyse est plus lente, ce qui explique une diminution d'activité antitumorale entre les deux molécules et selon les cancers de 15 à 30%.

Pour l'oxaliplatine, la réactivité du DACH-platine vis-à-vis de l'ADN est largement inférieure à celle du cisplatine, c'est-à-dire qu'en concentration équimolaire, l'oxaliplatine forme moins d'adduits que le cisplatine. Cependant, le potentiel cytotoxique de l'oxaliplatine est plus fort que celui du cisplatine dans de nombreuses cellules tumorales. Le groupement DACH fait saillie à l'extérieur du sillon majeur de l'ADN et produit un adduit plus encombrant que ceux formés par le diaquoplatine. Le positionnement du groupement cyclohexane, son encombrement, sa nature apolaire et le fait qu'il induit un rétrécissement du sillon majeur empêcheraient sa reconnaissance par les systèmes de réparation (notamment celui de réparation des mésappariements ou MMR).

Tableau IX. Principales caractéristiques du Cisplatine, Carboplatine et oxaliplatine [133].

	Cisplatine	Carboplatine	Oxaliplatine
Structure chimique			
	PM = 300,0 Da	PM = 371,3 Da	PM = 397,3 Da
Demi-vies du platine plasmatique	$T_{1/2\alpha}$ = 14-49 minutes $T_{1/2\beta}$ = 1-5 heures $T_{1/2\gamma}$ = 24-127 heures	$T_{1/2\alpha}$ = 12-98 minutes $T_{1/2\beta}$ = 1,3-1,7 heures $T_{1/2\gamma}$ = 8,2-40 heures	$T_{1/2\alpha}$ = 26 minutes $T_{1/2\gamma}$ = 38,7 heures
Demi-vies du platine ultrafiltrable	$T_{1/2\alpha}$ = 10-30 minutes $T_{1/2\beta}$ = 0,7-0,8 heures	$T_{1/2\alpha}$ = 7,6-87 minutes $T_{1/2\beta}$ = 1,7-7,9 heures	$T_{1/2\alpha}$ = 21 minutes $T_{1/2\beta}$ = 24,2 heures
Fixation protéique (4 heures)	> 90 %	24 %	85 %
Élimination	Rénale	Rénale	Rénale
Excrétion urinaire (24 heures)	23-50 %	54-82 %	> 50 %
Toxicité	Néphrotoxicité Neurotoxicité	Myélosupression	Neurotoxicité

En outre, et contrairement au cisplatine et au carboplatine, l'oxaliplatine a une action antitumorale *in vitro* et *in vivo* dans les tumeurs digestives et spécialement dans les cancers colorectaux. Il a montré cette activité tant en situation métastatique en mono comme en

bithérapie (en association avec le 5-Fluorouracile) (**voir page 29**) [12-13,134], qu'en situation adjuvante après résection complète de cancers du colon stade III (stade C de Dukes) (Essai MOSAIC comparant un schéma FOLFOX4 à un bras référence LV5FU2 ; Survie sans rechute à 3 ans 78,2% dans le bras FOLFOX4 versus 72,9% dans le bras sans oxaliplatine; HR : 0,77, p = 0,002), résultats confirmés très récemment par une réactualisation des données à 6 ans [135]. Cette efficacité sur le plan clinique, de l'association oxaliplatine et 5-Fluorouracile, démontrée depuis plus de 15 ans maintenant dans des essais cliniques de grande ampleur, a ainsi confirmé l'observation *in vitro* de la synergie entre ces deux molécules [136] : Cette synergie existe peut être encore plus avec l'oxaliplatine qu'avec le cisplatine, du fait que l'oxaliplatine engendre peu de ponts intrabrin, directement létaux pour la cellule, mais plutôt des cassures monobrin, potentialisées par l'inhibition de synthèse de thymidine par le 5-FU.

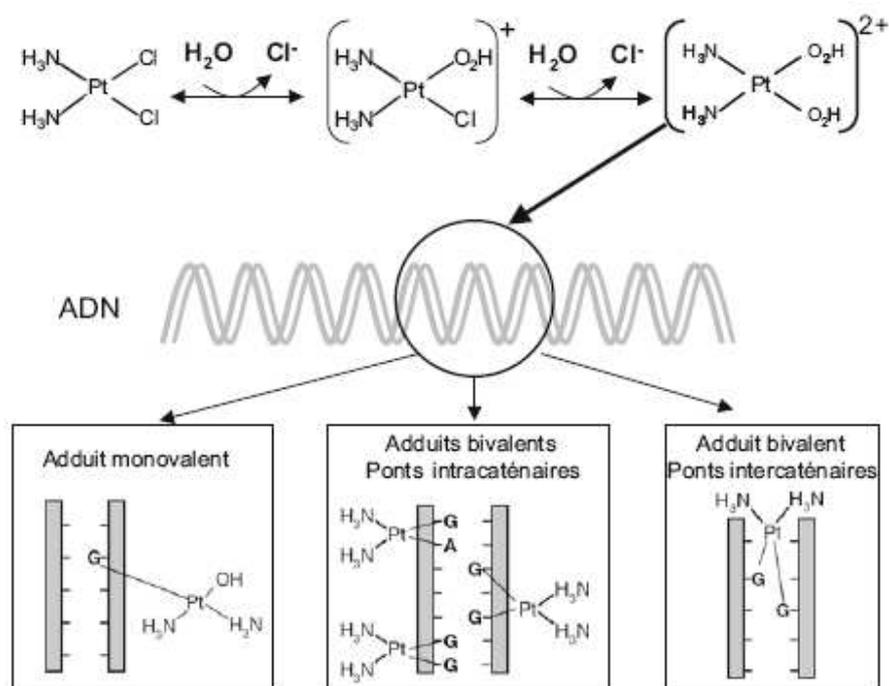


Figure 23. Hydrolyse du cisplatine et formation d'adduits au niveau de l'ADN.

2. Pharmacologie de l'Oxaliplatine.

Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'oxaliplatine ont fait l'objet d'une revue par Graham *et al.* [137]. L'oxaliplatine se comporte vis-à-vis des protéines plasmatiques de la même manière que le cisplatine avec une fixation rapide aux protéines de haut et de bas poids moléculaires, suivie de liaisons avec une haute affinité à l'albumine et aux gammaglobulines. Le platine se lie de façon irréversible aux érythrocytes dans lesquels il peut s'accumuler. La demi-vie du platine lié aux érythrocytes est de 60 jours, équivalente à celle des globules

rouges. Le platine lié aux cellules du sang ne peut être considéré comme un réservoir de forme active de médicament compte tenu de la nature irréversible de cette liaison et de l'absence d'efflux observé *in vitro*. C'est certainement l'hémoglobine, la protéine majeure des globules rouges, qui fixe le platine de façon covalente [138].

La biotransformation de l'oxaliplatine en dérivés actifs s'effectue par voie non enzymatique dans les solutions physiologiques par le déplacement du ligand labile oxalate. Plusieurs espèces réactives se constituent alors, notamment les formes monoquo- et diaquo- du groupe des 1,2-diaminocyclohexane (DACH)-platines, lesquelles se lient par covalence aux macromolécules. Il se crée également des ponts interbrins et intrabrins dans l'ADN à la position N7 de 2 guanines adjacentes, d'une adénine et d'une guanine adjacentes et de guanines séparées par un nucléotide, empêchant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN, d'où des effets cytotoxiques et antinéoplasiques.

L'élimination de l'oxaliplatine est majoritairement urinaire (50% de la dose administrée sont éliminés par les urines dans les 48 heures). La première phase d'élimination, dite phase d'élimination rapide (T_{1/2a}), correspond à l'élimination directe par filtration glomérulaire de l'oxaliplatine intact ou des intermédiaires dichloro-, monochloro- et diaquo-DACH-platine. Des études ont montré la corrélation entre la clairance rénale du platine ultrafiltrable et le débit de filtration glomérulaire suggérant que la filtration glomérulaire est le mécanisme d'élimination majoritairement impliqué après administration d'oxaliplatine. Il n'existe pas cependant de contre-indication à son utilisation pour des clairances de la créatininémie > 30 mL/min. Il est cependant possible (mais aucune étude n'a exploré cette hypothèse) que la clairance des dérivés de l'oxaliplatine pourrait être ralentie par l'administration concomitante de composés potentiellement néphrotoxiques.

Les études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal comme chez l'homme montrent que l'oxaliplatine n'est pas métabolisé par les isoenzymes du cytochrome P450 et n'inhibe pas l'activité de celles-ci chez l'être humain. Aucune interaction n'est donc à prévoir entre l'oxaliplatine et les médicaments métabolisés par ce système (contrairement à l'irinotecan).

Enfin concernant de possibles interactions médicamenteuses, l'administration d'une dose unique (homologuée : protocole FOLFOX, le plus couramment utilisé en France) de 85 mg/m² d'oxaliplatine immédiatement avant celle du 5-FU n'a pas modifié le degré

d'exposition du patient au 5-FU ; par ailleurs les études *in vivo* et les rapports de pharmacovigilance n'ont pas montré de modifications de liaison protéique du platine avec des médicaments tels que l'érythromycine, les salicylés, le valproate de sodium, le granisétron et le paclitaxel. Aucune interaction avec des aliments n'a été établie.

Finalement les principales caractéristiques pharmacocinétiques de l'oxaliplatine sont résumées dans les **tableaux IX et X**. La **figure 24** décrit les principaux produits de biotransformation du L-OHP et leurs niveaux d'activité cytotoxiques.

Tableau X. Principales études pharmacologiques concernant l'oxaliplatine (D'après Graham et al. 2000)

Study type	Dose (mg/m ²)	No. of cycles	No. of PK patients	5-FU ^a	Matrices evaluated ^b	No. of PK samples (duration)	Method (validation)	Ref.
Biotransformation <i>In vitro</i>	NA	NA	NA	NA	UF, P, B	NA	HPLC-UV, MS (validated), radiochemical	Shackleton and Allen (53)
	NA	NA	NA	NA	UF, U	NA	HPLC-UV, MS (validated), radiochemical	McDougall and Allen (34)
<i>In vivo</i>	130	1	5	-5-FU ^c	UF U	5 (0-48 h) 1-5 (1-5 days)	ICPMS (validated)	Allen et al. (21, 22)
Excretion Urine & feces	130	1	5	-5-FU	U Fe	5 (1-5 days) 1 (1-5 days)	ICPMS (validated)	Allen et al. (21, 22)
	130	1	6-7	-5-FU	U	9 (1-11 days)	ICPMS	Misset and Allain (30)
	130	5	6	-5-FU	Fe U	8 (1-21 days) 2 (0-48 h)	ICPMS (validated)	Graham et al. (19, 20)
	135-200	1	16	-5-FU	U	1 (0-24 h)	FAAS	Marty (28)
	130	2	13	+5-FU	U	1 (0-24 h)	FAAS (validated)	Kern et al. (23)
Special populations Renal impairment Age, sex, hepatic, renal impairment	130	1	24	-5-FU	UF, P, U	19 (0-144 h)	FAAS	Massari et al. (35)
	130	1	11-27	-5-FU	UF, U	NA	NA	Graham et al. (36)
Drug interactions 5-FU <i>in vivo</i>	85	1-7	18	±5-FU	P (5-FU)	6-8 (0-1 h)	HPLC-UV (validated)	Papamichael et al. (37, 38)
CYP450 metabolism <i>in vitro</i>	NA	NA	NA	NA	Microsomes	NA	P450 assays (validated)	Shackleton and Allen (31)
CYP450 inhibition <i>in vitro</i>	NA	NA	NA	NA	Microsomes	NA	P450 assays (validated)	Brandl and Brian (32)
Con. meds. <i>in vitro</i>	NA	NA		Con. meds.	S	NA	Ultrafiltration FAAS	Uriens and Tillement (44)

^a Pharmacokinetic assessments made in the presence (+) or absence (-) of 5-FU.

^b P, plasma; UF, ultrafiltrate; B, blood cells; U, urine; Fe, feces; S, serum; Con. meds, concomitant medications.

^c 5-FU administration delayed for 48 h during blood sampling for biotransformation and PK.

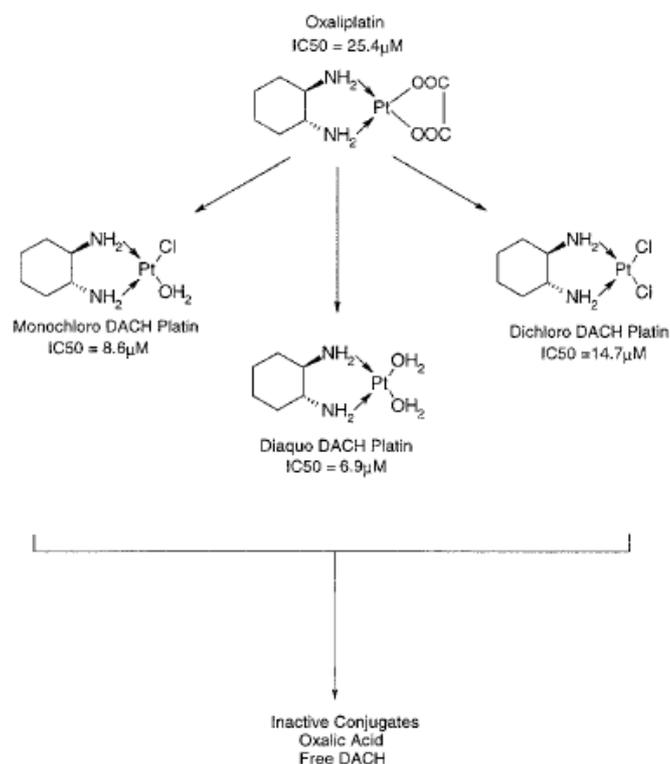


Figure 24. Principaux produits de biotransformation du L-OHP et leurs niveaux d'activité cytotoxiques (Valeurs IC₅₀ in vitro pour des cellules de carcinome colique humain lignée HT-29).

3. Profils de toxicités de l'Oxaliplatine.

Les principales toxicités observées avec l'oxaliplatine sont représentées par une *toxicité digestive* (nausées/vomissements) prévenues par l'utilisation de sétrons, une *toxicité hématologique* (surtout sur les lignées plaquettaire et granulocytaire), et une *alopécie généralement de faible intensité* (grade 1 dans 30% des cas). Mais c'est surtout la *toxicité neurologique, dose-limitante*, qui constitue la toxicité la plus sévère, pouvant potentiellement entraîner un important retentissement sur la qualité de vie (gênes dans les gestes fins de la vie quotidienne : écriture, fermeture des boutons de chemises, laçage, troubles de la marche par atteinte proprioceptive) et dont les traitements, pour les toxicités tardives, sont à la fois peu nombreux et peu efficaces (Lyrica[®], Rivotril[®]). En outre cette complication impose le plus souvent des adaptations posologiques (à la baisse) de l'oxaliplatine, des interruptions de traitements, et finalement peut donc compromettre le bénéfice de l'ensemble du schéma thérapeutique [139].

Neuropathie périphérique sensorielle.

Manifestations neurosensorielles aiguës.

Ce type de symptômes survenant généralement à la fin de la perfusion de 2 heures de l'oxaliplatine, ou dans les heures qui suivent, s'atténue spontanément après quelques heures ou quelques jours, et réapparaît fréquemment lors des traitements ultérieurs. Les symptômes neurosensoriels peuvent être déclenchés ou aggravés par une exposition à de basses températures ou par des contacts avec des objets froids. Ils se manifestent habituellement par une paresthésie, une dysesthésie ou une hypoesthésie transitoire. Un syndrome aigu de dysesthésie pharyngolaryngée s'observe chez de 1 à 2 % des patients; il se traduit par des sensations subjectives de dysphagie ou de dyspnée, de suffocation, sans signe de détresse respiratoire (absence de cyanose et d'hypoxie), de laryngospasme ou de bronchospasme (absence de stridor et de sifflements).

Dysesthésies, paresthésies des extrémités et neuropathie périphérique.

La toxicité limitant la dose d'oxaliplatine est essentiellement neurologique. Son incidence est estimée à près de 70% des patients traités, d'intensité variable [140]. Elle se traduit par une neuropathie périphérique sensorielle caractérisée par une dysesthésie et/ou une paresthésie des extrémités, accompagnées ou non de crampes, souvent déclenchée par une exposition au froid (85 à 95 % des patients).

La durée de ces symptômes, généralement régressifs entre les cycles de traitement, s'accroît avec la répétition de ceux-ci. La survenue de douleurs et/ou d'une gêne fonctionnelle nécessite, selon la durée des symptômes, l'ajustement de la dose, voire l'arrêt du traitement.

Cette gêne fonctionnelle, s'observant notamment par une difficulté à exécuter des gestes fins, est une conséquence possible de l'atteinte sensorielle. Le risque de survenue d'une gêne fonctionnelle pour une dose cumulée d'environ 800 mg/m² (soit 10 cycles) se chiffre à 15 % ou moins. Les signes et les symptômes neurologiques s'atténuent dans la majorité des cas à l'arrêt du traitement.

Autres manifestations neurologiques

Au nombre des autres symptômes qui ont parfois été observés, on a signalé un dysfonctionnement des nerfs crâniens pouvant prendre la forme d'un événement isolé ou de plusieurs événements combinés, notamment un ptosis, une diplopie, une aphonie, une dysphonie, un enrouement, parfois décrit comme une paralysie des cordes vocales, une sensation anormale à la langue ou une dysarthrie, parfois décrite comme une aphasie, une

névralgie faciale, une douleur faciale, fasciculations, une douleur oculaire, une baisse de l'acuité visuelle, une altération du champ visuel, une cécité passagère (réversible après l'arrêt du traitement), une amaurose et une cécité monoculaire transitoire. Les manifestations suivantes ont également été observées : spasme massétérin, spasmes musculaires, contractions musculaires involontaires, secousses musculaires, myoclonie, troubles de la coordination, démarche anormale, ataxie, troubles de l'équilibre et serrement/pression/inconfort/douleur dans la gorge ou dans la poitrine

A l'heure actuelle, aucun traitement n'a été validé pour prévenir cette complication. Des perfusions de Gluconate de Calcium et de Sulfate de Magnésium ont été proposées et pourraient constituer un début de solution [141] mais des études de plus grande ampleur sont encore nécessaires pour faire la démonstration de l'intérêt d'un tel dispositif préventif, et pour asseoir son implantation en pratique clinique courante. De nouveaux agents neuroprotecteurs (Xaliprodone, agent neurotrophique) ont également été testés avec des résultats encourageants dans la prévention de l'incidence de la neuropathie oxalino-induite [142], mais son développement reste hypothétique dans cette indication sans travaux de compléments définitifs.

Finalement les complications neurologiques de l'oxaliplatine sont si fréquentes et représentent un tel problème dans la gestion au quotidien d'un cytotoxique phare dans le traitement des cancers colorectaux, que d'importants efforts dans la compréhension de la physiopathologie de ces neuropathies ont été réalisés, cherchant à cerner des profils pharmacogénétiques de patients à « haut risque ». Les mécanismes impliqués dans la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine restent encore à l'heure actuelle relativement obscurs. Cependant plusieurs hypothèses et observations peuvent être avancées.

- ✓ Les agents platinants, via la formation d'adduits sur l'ADN, pourraient affecter les axones, la myéline et les structures gliales des neurones, et spécialement au niveau des nerfs périphériques et des ganglions spinaux des racines postérieures de la moelle
- ✓ Comme agents de type « métaux lourds », l'oxaliplatine est éliminé par des systèmes enzymatiques impliquant particulièrement la *Glutathione S-Transferase π 1 (GSTP1)*. Plusieurs polymorphismes retrouvés au sein du gène de cette enzyme, ont été investigués dans plusieurs études translationnelles dans le but de rechercher des corrélations possibles entre ces polymorphismes et l'intensité des neurotoxicités, avec des résultats variables et finalement peu concluants [143-144]. **L'exploration de cette**

voie de recherche cherchant à cibler des polymorphismes à risque de la GSTP1 fait l'objet d'une des publications présentées dans notre travail de Thèse (Publication N°3)

- ✓ Des études biopsiques sur prélèvements nerveux préalablement exposés à l'oxaliplatine n'ont pas montré de corrélation entre les symptômes neurologiques présentés par les patients et une dégénérescence objective axonale [145]
- ✓ La neurotoxicité pourrait impliquer l'oxalate, produit par hydrolyse de l'oxaliplatine, qui est un chélateur du calcium et qui va interférer avec l'ouverture des canaux sodiques calcium-dépendants. Ces canaux sont impliqués dans la transmission du potentiel d'action des cellules excitables lors de la dépolarisation cellulaire et leur dysfonctionnement pourrait être responsable des manifestations neurotoxiques [146] ; des polymorphismes impliqués dans la voie du métabolisme de l'oxalate pourrait représenter une voie de recherche originale, notamment au niveau de l'enzyme *Glyoxylate AminoTransferase (AGXT)* ; **cette hypothèse a été explorée dans deux des études présentées dans notre travail de Thèse (Publications N°3 et N°5).**

4. Mécanismes de résistance à l'Oxaliplatine.

L'échec des chimiothérapies anticancéreuses est en partie dû à des phénomènes de résistance intrinsèque à la tumeur, présente d'emblée ou acquise au cours du traitement.

Six processus majeurs ont été répertoriés dans la résistance aux sels de platine :

- une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament
- une inactivation par conjugaison avec des groupements thiols
- une augmentation de la réparation de l'ADN
- une modification de la fonction de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire
- la tolérance aux lésions formées par une synthèse translésionnelle
- l'altération de l'induction de la mort cellulaire (par surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xl [147-148]).

Une diminution de 20 à 70% de la concentration en cisplatine a été observée dans les lignées cellulaires résistantes au cisplatine. Les mécanismes potentiellement impliqués dans cette diminution de l'accumulation sont les phénomènes d'influx et d'efflux (détaillés dans la revue de Rabik *et al.* [149]), notamment par les transporteurs du fer (Ctr1, ATP7B et ATP7A), mais aussi par MRP2 (ABCC2 ou cMOAT) [150]. La voie de conjugaison au glutathion intervient

dans la détoxification des dérivés de platine et diminue leur cytotoxicité en inhibant la formation d'adduits à l'ADN [151]. Ainsi des concentrations augmentées de GSH ont été observées dans des lignées cellulaires résistantes au cisplatine [152-153] et dans des tumeurs issues de patients résistants au cisplatine [154-155]. Les métallothionéines, qui jouent un rôle dans l'homéostasie des ions Zn^{2+} et dans les mécanismes de détoxification des métaux lourds, peuvent être impliquées dans la détoxification des dérivés de platine.

Enfin les mécanismes impliqués dans la réparation des adduits de platine sur l'ADN sont majoritairement le système de réparation par excision de nucléotides (NER) qui élimine les mutations induites par des carcinogènes environnementaux et le système de réparation des mésappariements (MMR) qui répare des erreurs de réplication (**Figure 25**). Le NER répare les adduits des trois dérivés de platine et diminue donc leur cytotoxicité. Les protéines du NER comme XPA, ERCC1-XPF et XPB ont une expression plus élevée dans les tumeurs résistantes aux dérivés de platine [156-157]. Le MMR fonctionne différemment, puisque les protéines du MMR reconnaissent les adduits formés par le cisplatine et le carboplatine sur l'ADN, mais ne permettent pas de les réparer. Tout au contraire, elles vont induire l'apoptose de la cellule et par conséquent, participer à la cytotoxicité. Aussi, les cellules déficientes en MMR (souvent liées au phénotype d'instabilité des microsatellites MSI) présentent une résistance au cisplatine et au carboplatine.

L'oxaliplatine, en revanche, n'est pas reconnu par le MMR donc ce système ne contribue pas à sa cytotoxicité et peut être utilisé dans des tumeurs déficientes en MMR, comme les tumeurs colorectales dans lesquelles le cisplatine ou le carboplatine ne sont pas actifs.

Les protéines de la famille HMG1 (high mobility group) présentent la spécificité de reconnaître les adduits à l'ADN formés par le cisplatine. Elles peuvent protéger les adduits de platine des enzymes de réparation de l'ADN et contribuer à leur toxicité en se liant à eux, empêchant l'accès aux lésions des protéines du NER : XPG et XPF. Dès lors, ces endonucléases ne peuvent exciser le nucléotide lésé et les adduits persistent sur l'ADN [158]. L'inactivation des protéines à boîte HMG va faciliter l'activité du NER et par conséquent, l'excision des adduits de platine.

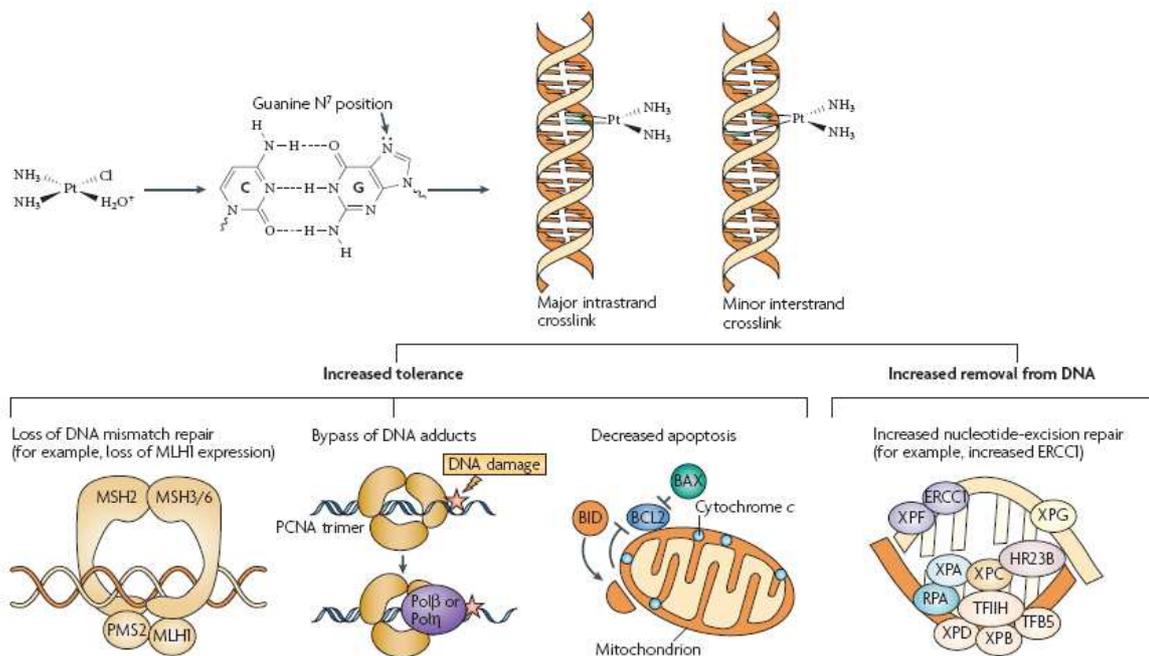


Figure 25. Les différents mécanismes possibles de résistance aux sels de platine après la formation des adduits sur l'ADN. La déficience du système MMR ne concerne pas l'oxaliplatine. L'inhibition apoptotique, des mécanismes annexes de réparation et l'hyperactivation du système NER (via ERCC1 par exemple) peuvent par contre constituer de potentiels facteurs de résistance à l'oxaliplatine. (d'après Kelland. Nature Reviews 2007 [159]).

La recherche de corrélation entre les polymorphismes impliqués au niveau des gènes de réparation de l'ADN sur le plan germlinal (à partir de leucocytes circulants), et non des cellules tumorales, et l'observation d'éventuelles résistances (variation des taux de réponses à l'oxaliplatine) et de toxicités pourrait permettre de sélectionner des patients à risque prévisionnel (et donc en pré-thérapeutique) de mauvaise réponse à une chimiothérapie à base d'oxaliplatine. Cette recherche fait l'objet des publications N°3, 4 et 5 de notre Thèse d'Université.

III. TRAVAUX PERSONNELS

III. TRAVAUX PERSONNELS
A. PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Notre travail de Thèse d'Université s'appuie sur les notions de pharmacogénétique développées dans la première partie de notre exposé (**Chapitre II.2**) et sur les données les plus récentes de la connaissance des métabolismes souvent complexes des trois principaux agents cytotoxiques utilisés dans le traitement du cancer colorectal métastatique : le 5-fluorouracile, l'irinotecan et l'oxaliplatine que nous avons introduits précédemment. Ces trois agents cytotoxiques constituent en effet à l'heure actuelle - et très probablement pour encore longtemps -, les traitements de chimiothérapie les plus utilisés à travers le monde et les plus efficaces dans cette indication, seuls ou en combinaison avec la nouvelle génération de thérapies dites « ciblées ».

Il nous a paru évident dans le contexte scientifique d'individualisation thérapeutique de nous intéresser à ces molécules afin d'en caractériser les risques et les bénéfices, et ainsi de nous permettre d'envisager dans leur utilisation un meilleur rationnel. Ce dernier ne pourra que rendre d'autant plus efficace en terme de taux de réponses comme en terme de survies, l'adjonction de molécules plus récentes (mais également nettement plus chères, et non dénuées de risque de toxicité comme de résistance), tels que les anticorps monoclonaux anti VEGF ou anti EGFR. La fréquence importante au sein de la population générale et la sévérité du pronostic des cancers colorectaux au stade métastatique (**Chapitre II.1**), font de cette recherche un élément indispensable dans l'évolution de l'Oncologie moderne tant en terme humain qu'en terme pharmacoéconomique.

Ce travail a été rendu possible par l'accueil qui nous a été fait pendant plus de cinq ans maintenant dans l'Unité de Recherche INSERM U892, dirigée par monsieur le Professeur Erick GAMELIN, unité dont le domaine de prédilection est justement la caractérisation de facteurs génétiques et génomiques en vue d'optimiser les traitements cytotoxiques et notamment dans les tumeurs digestives. Ce travail a ainsi pu bénéficier de l'expérience et des résultats des travaux de l'équipe dirigée par Monsieur le Professeur GAMELIN au sein de laquelle Monsieur le Professeur Alain MOREL et Madame le Docteur Michèle BOISDRON-CELLE ont apporté leur vision respectivement de biologie moléculaire et de pharmacologie. Leur aide constante et amicale a rendu possible *ce travail résolument translationnel*, axé sur les conséquences cliniques pour le patient d'une biologie métabolique pouvant paraître, au premier abord en tout cas, difficile pour les praticiens cliniciens de par sa complexité, mais dont l'importance – cela est sûr -, ne fera que croître dans les années futures pour la considération des protocoles de prise en charge.

Nous avons donc pu bénéficier pendant ces années de Thèse, de la richesse d'un plateau technique offrant des possibilités de recherche sur le plan génétique comme génomique avec mise au point de techniques à haut débit et fiables (notamment via le pyroséquençage), autorisant des études sur des cohortes conséquentes de patients. De même, l'utilisation systématique de l'adaptation pharmacocinétique de doses du 5-fluorouracile est de pratique courante au sein du Centre Paul Papin, et systématiquement utilisée lors de la délivrance de chimiothérapie à base de cet antimétabolite dans le cadre des cancers colorectaux, assurant un traitement au plus près du métabolisme des patients et prenant finalement en considération les phénomènes épigénétiques encore mal élucidés du 5-FU.

Enfin, dans chacune des études présentées dans le cadre de ce travail, nous avons cherché à individualiser des cohortes de patients homogènes afin de limiter au maximum les risques de biais liés à des facteurs environnementaux, d'âge, d'état général (Performance Status) et de lignes de chimiothérapie. Nous nous sommes attachés à étudier sur le plan pharmacocinétique et pharmacogénomique des schémas de traitements, dans un premier temps « simples », à base de 5-fluorouracile modulé par l'acide folinique afin d'isoler des facteurs prédictifs de réponses et de toxicités strictement liés à ce type de combinaison et sans interaction *a priori* avec d'autres voies métaboliques impliquées par des agents cytotoxiques annexes. Dans un deuxième temps et fort de cette expérience et de ces résultats, il nous a semblé utile d'entreprendre le même type de recherche sur des protocoles plus complexes associant à ce traitement de « base » des molécules plus récentes telles que l'irinotecan (protocole FOLFIRI) et l'oxaliplatine (protocole FOLFOX-4), en intégrant pour chacune d'entre elles leurs données de pharmacogénétiques propres. Les résultats de ces études, bien que rétrospectives, permettent néanmoins d'envisager un rationnel global dans la prise en charge des cancers colorectaux en phase métastatique prenant en compte les toxicités prévisibles, les possibilités d'intensification de traitement, le confort du patient et sa qualité de vie, et ce, dans le cadre général de l'objectif thérapeutique fixé par l'extension de la maladie au moment de sa découverte (**Figure 6, page 35**) et/ou son évolutivité en fonction de la réponse au traitement. Ce rationnel et ses conséquences thérapeutiques « sur le terrain » seront explicités dans notre conclusion.

III. TRAVAUX PERSONNELS
B. PATIENTS ET METHODES

1. Sélection des cohortes de patients.

1.1. Aspects éthiques et réglementaires.

L'état clinique, psychologique ou de conscience des patients dans toutes nos études étaient compatibles avec la signature d'un consentement éclairé sur les recherches génétiques possiblement en cours ou envisageables dans notre Centre.

Ces études étant basées sur une analyse rétrospective de données comportant l'examen de caractéristiques génétiques des sujets, elles ont été menées dans le cadre de la loi Huriet (art. L. 145-15 du Code de la Santé Publique) et tous les patients ont donc signé (depuis 2000 dans notre Centre) un consentement éclairé avant prélèvements sanguins, en acceptant que leur ADN germinale isolé à partir des leucocytes circulants puisse faire l'objet d'études ancillaires, fondamentales ou appliquées, en cours ou à venir.

Enfin le recueil des données cliniques concernant chaque patient (taux de réponse, toxicités, iconographies...) ont été recueillies sous couvert de confidentialité dans les dossiers patients « papier » ou plus récemment « informatisés », avec création de bases de données Excel© qui ont été exploités pour les méthodologies statistiques.

1.2. Critères d'éligibilité : Pour chacune des études présentées ici, chaque patient était suivi au Centre Paul Papin (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer d'Angers), était âgé de plus de 18 ans, et atteint d'un cancer colo-rectal métastatique avec cible(s) mesurable(s). L'espérance de vie estimée était supérieure à trois mois avant le début du traitement, et l'état général en permettait sa réalisation selon les bonnes pratiques médicales.

En ce qui concerne les caractéristiques avant traitement, le Performance Status (PS) classé de 0 à 3 répondait à la définition OMS. La bilirubine totale (facteur déterminant pour l'irinotecan) était considérée comme normale si ≤ 10 mg/L ou ≤ 22 μ mol/L. Les transaminases devaient être inférieures à 1,5 X normale. Les marqueurs sériques ACE et CA 19.9 avant chimiothérapie sont considérés comme normaux pour des taux inférieurs respectivement à 3 UI/ml et 30 UI/ml.

Les patients à risque cardio-vasculaire ont bénéficié d'une consultation de cardiologie autorisant la mise en route d'un traitement par fluorouracile.

Les délais de prise en compte pour l'inclusion rétrospective et les modalités de traitement sont variables pour chaque étude et détaillés dans l'article qui leur est rapporté.

1.3. Evaluation des réponses.

L'évaluation de la réponse réalisée en général trois mois après le début du traitement quelles que soient ses modalités, était également définie **selon les critères RECIST à savoir:**

Réponse complète : disparition des lésions cibles

Réponse partielle : diminution d'au moins 30% de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible.

Progression tumorale : augmentation d'au moins 20% de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible.

Stabilité tumorale : diminution tumorale insuffisante pour définir une réponse partielle et/ou augmentation tumorale inférieure à celle nécessaire pour définir une progression.

1.4. Toxicités.

Les grades de toxicités étaient codifiés selon la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Concernant la neurotoxicité propre à l'oxaliplatine, la classification américaine du NCI (National Cancer Institute) a par contre été privilégiée.

1.5. Définitions des Survies.

Survie sans progression.

La survie sans progression (ou survie spécifique : l'événement est la « progression tumorale ») est définie par la période séparant la date du diagnostic de la date de la progression tumorale objectivée par des critères cliniques (occlusion, ictère, symptomatologie évocatrice d'une nouvelle localisation métastatique), et/ou iconographiques (tomodensitométrie, échographie, radiographies standards) et/ou biologiques (altération du bilan hépatique, marqueurs ACE et CA 19.9) sous traitement tel que décrit dans l'étude.

Survie globale.

La survie globale (l'événement est le « tout décès ») est définie par la période séparant la date du diagnostic de la date du décès, intégrant la date et le statut aux dernières nouvelles, quels que soient les traitements reçus au décours de ceux décrits dans l'étude.

1.6. Méthodes statistiques utilisées.

Logiciels.

Les études statistiques descriptives et analytiques ont été réalisées sous les logiciels SPSS© et SAS 9.1.3© (USA).

Types d'analyses et tests employés.

Le test du Chi² a été utilisé pour comparer la fréquence de chacun des allèles avec sa fréquence attendue selon les lois de répartition homogène dans la population générale de Hardy-Weinberg. Les facteurs bien connus pronostiques dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques ont été pris en compte (test du Chi² ou de Fisher) afin d'éviter les biais sur les taux de réponses, de survies et de toxicités corrélés aux polymorphismes étudiés (nombre de sites métastatiques (1 vs more), performance status (ECOG 0 or 1 vs 2), âge (< 60, 61-70 et > 70 ans) et sexe. Les facteurs pronostiques d'efficacité et de tolérance ont été analysés par régression logistique. Le risque d'erreur α était classiquement choisi à 5%.

Les courbes de survies ont été réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier. Le modèle de Cox de régression uni- ou multivarié a été utilisé pour la recherche de corrélation entre les génotypes étudiés et les survies sans progression et les survies globales. Pour les modèles multivariés, seuls les génotypes ou les paramètres cliniques avec un $p < 0,25$ en analyse univariée étaient retenus pour l'analyse avec prise en compte des facteurs de confusion et d'interaction.

2. Méthodes de génotypage.

2.1 Isolement de l'ADN germinale.

L'étude du génotype des patients a été réalisée à partir de l'ADN germinale (ADNg) extrait des leucocytes circulants : un prélèvement sanguin est donc effectué sur anticoagulant. A 500 μ L de sang total est ajouté 1 ml de solution de lyse (Red Blood Cell Lysis Buffer, Roche®) permettant la destruction des globules rouges par choc osmotique tout en conservant les globules blancs. Après élimination du surnageant, 500 μ L de solution de protection des acides nucléiques (RNA/DNA stabilisation reagent for blood/bone marrow, Roche®) étaient ajoutés au culot, lysant les membranes cellulaires tout en conservant les acides nucléiques. La conservation de l'échantillon s'est faite à - 20°C. Après dilution de la solution de conservation, homogénéisation et adjonction de protéinase K détruisant les protéines, une tablette MGP (Magnetic Glass Particles) a été ajoutée qui permettra au cours d'une incubation en milieu salin la fixation de l'ADN sur des billes de verre magnétiques. Après plusieurs lavages, les billes se fixant à un portoir magnétique, celles-ci ont été finalement sédimentées par centrifugation : les 100 μ L de surnageant contenant l'ADNg ont été récupérés et conservés à 4°C.

2.2. Polymorphisme de la thymidylate synthase (TYMS).

Notons d'emblée que l'amplification de la région d'intérêt de la Thymidylate Synthase n'est pas rendue aisée du fait du grand nombre de doublets nucléotidiques G/C répétitifs assurant une forte covalence (3 liaisons) entre les deux brins d'ADN d'une part avec difficulté de désappariements (difficulté à la mise au point optimale pour le nombre de cycles, le pH et les températures), mais également du fait de la haute fréquence d'hybridations non spécifiques ce qui nous a obligé à l'utilisation de DMSO afin d'augmenter la stringence du milieu de PCR (force ionique faible).

Dans le cadre de la première étude (**Publication N°1**), l'analyse du polymorphisme au sein de la région promotrice du gène de la TYMS a été réalisée par une analyse par PCR décrite ci-après, suivie d'une technique de RFLP pour la mise en évidence du polymorphisme G>C au sein de la deuxième région de répétition « R » de l'allèle 3R.

Dans les études FOLFIRI (**Publication N°2**) et FOLFOX-4 (**Publication N°3 et N°4**), la mise en évidence de ces polymorphismes a été réalisée par des techniques de pyroséquençage assurant une meilleure fiabilité et un haut débit dans le rendu des résultats. Cette dernière méthode a été mise au point par Mlle Asevoaia Andreaa dans notre laboratoire et au cours de son propre travail de Thèse.

2.2.1. Amplification de l'ADNg pour TYMS par la technique de Polymerase Chain Reaction.

Cette technique a été développée au cours de notre travail de Master2, avec modification de l'amorce anti-sens par rapport à une précédente étude réalisée dans notre laboratoire. En effet, le produit d'amplification ne permettait pas, du fait de la taille des fragments obtenus après digestion enzymatique par Hae III, la mise en évidence de la mutation G>C dans la 2^e séquence de répétition de l'allèle 3R. Le choix de la nouvelle amorce a été fait au vu de la littérature, l'amorce sens de notre laboratoire, initialement choisie après interrogation du programme Primer 3 Output sur internet, étant très proche de celle de Kawakami *et al.* (**Voir Pharmacologie du 5-fluorouracile**). Après mise au point pour les concentrations de MgCl₂ et de DiMéthylSulfOxyde (DMSO), et pour le nombre de cycles de PCR, la technique utilisée en routine est décrite ci-après.

ETUDE DU POLYMORPHISME DU PROMOTEUR DE LA THYMYLATE SYNTHASE PAR PCR.

➤ Utiliser le couple d'amorces appelé « TS » (numéroté 689 / 1245)

➤ Travailler au maximum dans la glace

➤ **Protocole :**

Mix PCR	H ₂ O qsp 25 µL	14,6 µL
	Tampon 10 X	5 µL
	MgCl ₂ 25 mM	3 µL
	dNTP + UTP 10 mM	2 µL
	TAQ commerciale	0,4 µL

Mix Amorce	DMSO (5 % final)	2.5 µL
	H ₂ O qsp 24 µL	19,5 µL
	Amorce TS 10 µM	2 µL

+ 1 µL ADNg (100 ng/µL)

+ 1 goutte d'huile

➤ **Témoins :**

	ADN	Glycérol stock
2R (1/800)	n° 144	n° 142
3R (1/800)	n° 145	n° 143
4R (1/800)	n° 162	n° 210

➤ **PCR : HYBAID : prog 36**

94 °C 3 min	}	35 cycles
94 °C 30 sec		
60 °C 30 sec		
72 °C 1 min		
72 °C 3 min		

➤ **Dépôts :**

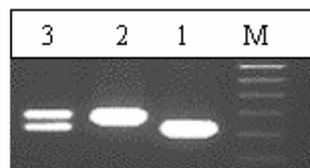
8 µL de PCR sur gel d'Agarose 2% TBE 1 X

2 µL de bleu

1 : Homozygote 2R (108 pb)

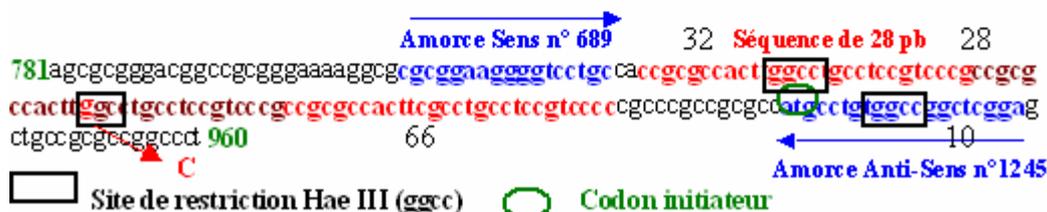
2 : Homozygote 3R (136 pb)

3 : Hétérozygote 2R / 3R



Séquence de la région promotrice de la TS contenant les trois répétitions de 28 pb

Les positions des amorces Sens et Anti-Sens sont indiquées, ainsi que les sites de restriction pour Hae III et la position de la mutation C>G dans la seconde séquence de répétition.



2.2.2. Visualisation des produits d'amplification (Figure 26).

Ils sont visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose 2% en présence de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/µL, agent intercalant des acides nucléiques. Un marqueur de poids moléculaire 50 pb analysé simultanément permet de déterminer la taille des brins.

Les témoins positifs sont les clones (amplifiés dans un plasmide recombinant) utilisés au 1/800e, développés antérieurement dans le laboratoire du centre Paul Papin et correspondant aux génotypes 2R/2R, 2R/3R et 3R/3R. **Le témoin négatif** est une préparation « mix PCR » sans ADNg ajouté révélant ainsi une éventuelle contamination si une bande devait être visualisée.

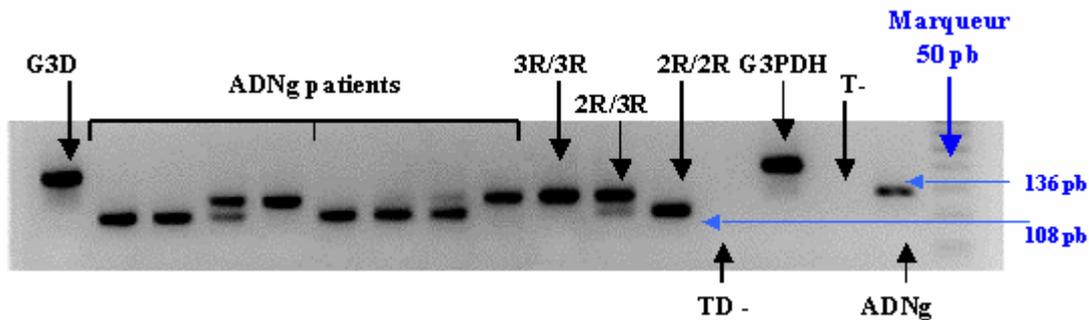


Figure 26. PCR de la région promotrice de la thymidylate synthase. Electrophorèse sur gel d'agarose 2%. Visualisation des génotypes principaux après migration sur gel dans du tampon TBE 1X (à droite). La taille des amplicons est de 108 pb pour un fragment 2R, de 136 pb pour un fragment 3R.

G3PDH= Glycéraldéhyde-3-phosphodéshydrogénase (gène exprimé constitutionnellement dans toutes les cellules)

G3D=G3PDH avec DMSO (DiMéthylSulfoxyde).

2.2.3. Mise en évidence de la mutation G>C de la thymidylate synthase par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

Le produit d'amplification est concentré par purification grâce au système QIAquick™ (Qiagen®) qui utilise les variations d'affinité de l'ADN à une membrane de silice en fonction du pH et des concentrations de sels dans le milieu. L'éluion, pendant la centrifugation (13000 tr/min), qui a lieu en milieu alcalin pauvre en sels permet l'élimination des primers et des impuretés telles que les enzymes, les nucléotides non incorporés ou le DMSO qui fuient à travers la colonne. La taille des fragments d'ADN retenus va de 100 pb à 10 kb. Le produit de purification (30 µL) est digéré pendant 150 minutes en présence de tampon Buffer 2 (4 µL pour une concentration finale de 1X) par l'enzyme Hae III (Sigma®) (1µL), dont le site de restriction GGCC au niveau de la deuxième séquence de répétition de l'allèle 3R est aboli en cas de mutation G>C. Les fragments d'ADN obtenus sont visualisés après migration sur gel d'agarose 3% dans du tampon TAE (Tris, Acide acétique et EDTA) 1X (**Figure 28**). Les tailles prévisibles des fragments après coupures au niveau des sites de restriction sont visualisées sur la **Figure 27**.

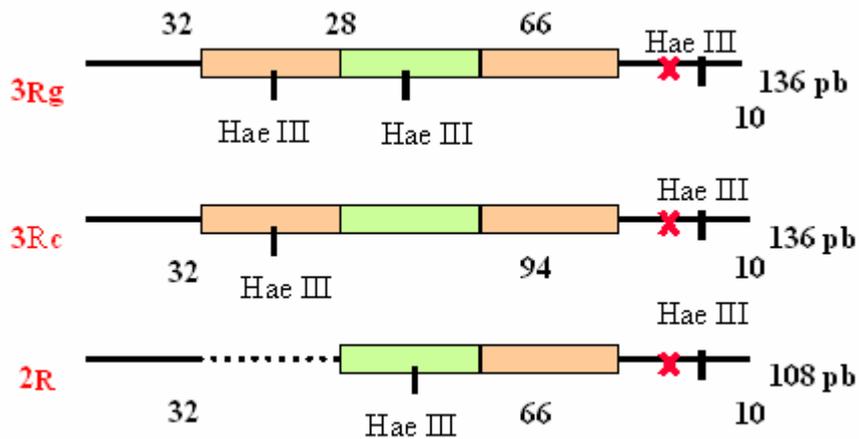


Figure 27. Sites de restriction pour Hae III. La croix indique la position du codon ATG. Les nombres indiquent la taille prévisible des différents fragments.

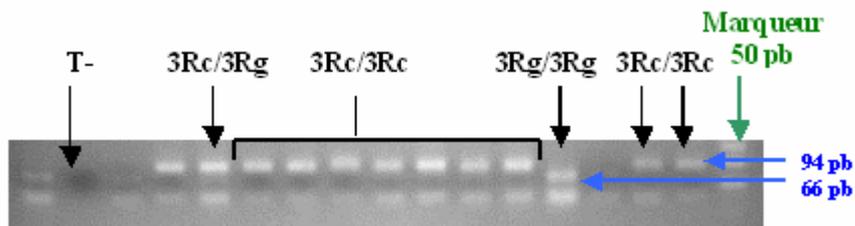


Figure 28. Electrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments de restriction après digestion du produit d'amplification par Hae III. T- = Témoin négatif.

2.3. Polymorphismes de la DPYD, MTHFR, UGT1A1 et des gènes de réparations de l'ADN impliqués dans le métabolisme de l'oxaliplatine (pour ces derniers : voir articles N°3 et N°4).

Tous ces polymorphismes ont été étudiés sur ADN germlinal de patients, isolé à partir des leucocytes circulants périphériques (simple prélèvement sanguin), et en utilisant les techniques de mini-séquençage luminométrique en temps réel ou pyroséquençage.

2.3.1. Pyroséquençage.

Le pyroséquençage est un séquençage par élongation d'amorces par distribution ordonnée de nucléotides (la position de la mutation étant connue) en nombre réduit (50 au mieux), obligeant à une amorce de séquence (10 à 15 pb) proche de la mutation à caractériser.

Quatre étapes successives sont nécessaires :

- *Purification sur plaque de PCR des produits PCR biotinylés (simple brin) par des billes de Sépharose™ couplées à la streptavidine en présence d'un tampon de liaison :* Le mélange est agité pendant 5 minutes à température ambiante. En parallèle le milieu d'hybridation soit 50 µL de tampon d'hybridation et 15 pmoles d'amorces de séquence est préparé dans les puits d'une seconde plaque à fond plat (**Figure 29**).
- *Préparation de l'ADN simple brin :* A l'aide d'un système d'aspiration, les billes fixant les produits PCR biotinylés sont retenues à l'extrémité de pics d'un bloc en « hérissron » muni de mini-capillaires (96 pics en tout). La dénaturation de ces produits PCR s'effectue par un lavage en aspiration dans 3 bains successifs (Ethanol 70% puis 0,2M NaOH et enfin un tampon de lavage pH 7,6 éliminant l'ADN non biotinylé). Les billes ayant les ADN monocaténaires biotinylés sont déposés par arrêt de l'aspiration dans les puits correspondant de la plaque à fond plat (**Figure 29**).

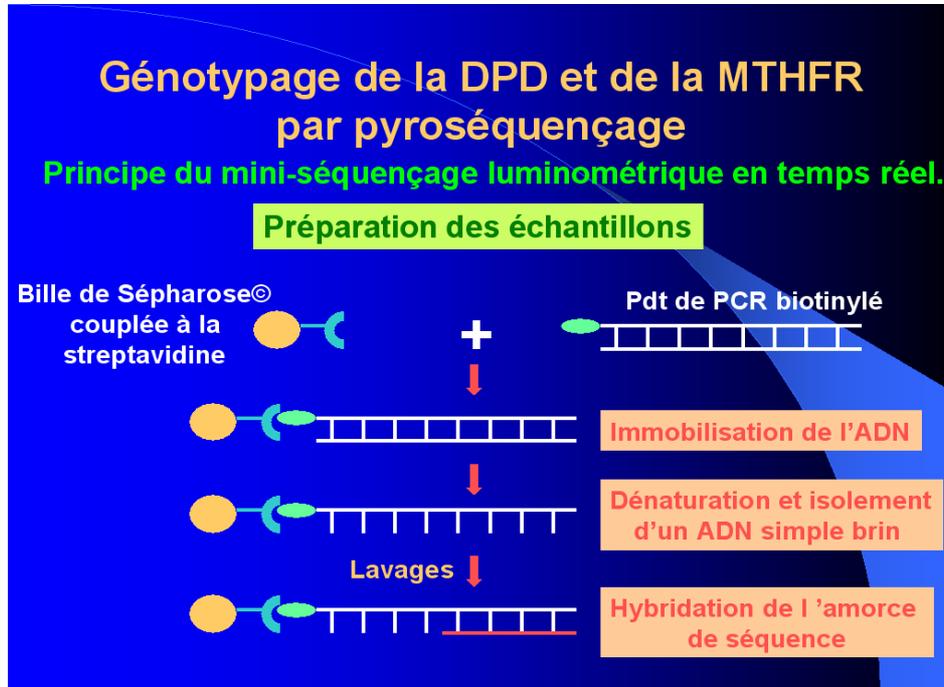


Figure 29. Principes du mini-séquençage luminométrique.

- *Hybridation de l'amorce de séquence* qui s'effectue par incubation à 80°C pendant 2 minutes. La plaque est enfin déposée dans le pyroséquenceur avec installation de la cartouche d'injection contenant les enzymes (ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase), les substrats (adénosine 5' phosphosulfate (APS) et luciférine) et les 4 désoxynucléotides (dNTP) où le dATP α S (désoxyadénosine α -thio triphosphate) remplace le dATP (désoxyadénosine triphosphate) qui n'est pas reconnu par la luciférase.
- *Miniséquencage* : L'addition des dNTP s'effectue séquentiellement. L'ADN polymérase catalyse la liaison de dNTP en 3' de l'amorce. L'incorporation induit un relargage de pyrophosphate (PPi), qui est convertit en ATP par l'ATP sulfurylase en présence d'APS. L'ATP ainsi formé permet la conversion par la luciférase de la luciférine en oxyluciférine, réaction qui s'accompagne de l'émission d'un signal lumineux proportionnel à la quantité de base polymérisée et enregistré sous la forme d'un pyrogramme (**Figure 30**).

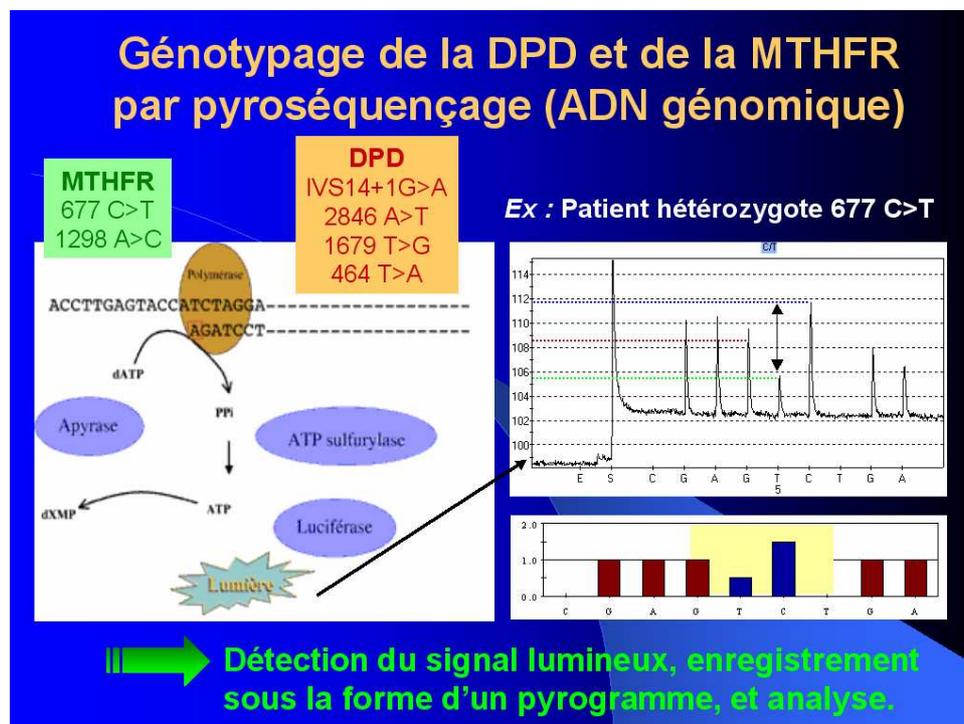


Figure 30. Principes du mini-séquencage luminométrique (Suite).

2.3.2. Polymorphismes de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD).

Les études génotypiques de la DPYD ont été couplées à la mesure du rapport plasmatique dihydrouracile/uracile (UH₂/U) (**Voir plus loin 3. Méthode de phénotypage**). Les quatre mutations les plus fréquentes dans la population caucasienne ont été systématiquement recherchées chez tous les patients par des méthodes de Polymérase Chain Reaction (PCR) et la technique de pyroséquençage: Il s'agit de la mutation IVS 14 +1G>A induisant la délétion complète de l'exon 14 lors de l'épissage, de la mutation 2846 A>T sur l'exon 22, de la mutation 1679 T>G sur l'exon 13 et de la mutation non-sens 464 T>A plus récemment mise en évidence dans le laboratoire. Une dernière mutation faux-sens T85C, décrite chez E.Coli, a été également recherchée mais celle-ci n'entraîne pas dans notre expérience de risque de toxicité (**Annexe 1**).

2.3.3. Génotypage de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR).

Il est réalisé après amplification PCR par amorce biotinylée des exons MTHFR présentant une mutation d'intérêt (exon 4 pour la 677 C>T et exon 7 pour la 1298 A>C) et s'effectue également par mini-séquençage luminométrique en temps réel (**Annexe 2**).

2.3.4. Génotypage de l'uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1).

La réalisation du pyroséquençage de la région d'intérêt de la TATAA Box du gène de l'UGT1A1 a suivi les procédures de mises au point décrites par notre laboratoire [160].

Les PCR comprenaient une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 95°C, suivie de 50 cycles avec dénaturation pendant 30 secondes à 95°C, hybridation via les primers pendant 30 secondes à 60°C, puis séquence d'extension pendant une minute à 72°C ; enfin les PCR étaient finalisées par une séquence d'extension pendant 5 minutes à 72°C. Toutes les opérations étaient réalisées sur DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, Boston, MA) avec une unité de Taq Polymerase (Euroblue Taq; Eurobio, France).

Les différents primers utilisés pour la séquence de pyroséquençage ont été préalablement décrits [1]. Les réactions elles-mêmes étaient réalisées à 28°C sur pyroséquenceur automatisé PSQ 96 instrument (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). Le temps optimal entre l'intégration de deux nucléotides pour l'obtention d'un pyrogramme de bonne qualité était de 120 secondes (**Figure 31**).

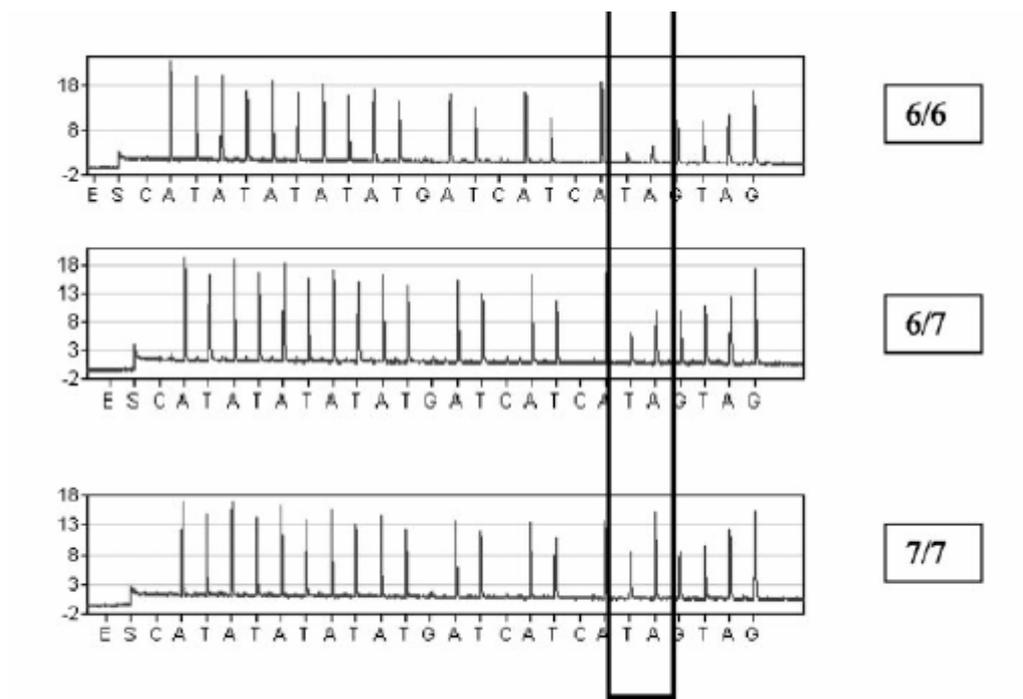


Figure 31. Pyrogrammes typiques attendus selon les polymorphismes de l'UGT1A1.

3. Méthodes de phénotypage : Utilisation de la pharmacocinétique du 5-FU.

Deux modalités de traitements par 5-FU ont été réalisées dans la **publication N°1**:

Soit un protocole LV5FU2 de type De Gramont « adapté » bimensuel défini par :

- Elvorine 200 mg/m² à H0 de J1.
- Fluoro-uracile 400 mg/m² en bolus IV sur 10 mn à H2 de J1 suivi immédiatement par 2500 mg/m² en perfusion de 46 heures.
- Surveillance pharmacologique : prélèvement de 5 ml de sang à H43.

Soit un protocole de type FUFOL 4 heures hebdomadaire comportant :

- Elvorine 100 mg/m² à J1.
- Fluoro-uracile 1200 mg/m² à J1 sur 4 heures.
- Surveillance pharmacologique : prélèvement de 5 ml de sang à H3.

Pour les autres études clinicobiologiques présentées dans cette Thèse, les modalités du FOLFIRI comme du FOLFOX-4 sont les mêmes concernant strictement le 5-FU que le schéma LV5FU2, mais avec rajout respectivement de 180 mg/m² pour l'irinotecan en standard et 85 mg/m² pour l'oxaliplatine.

CARACTERISATION DES POLYMORPHISMES DU GENE DE LA DIHYDROPYRIMIDINE DESHYDROGENASE (DPD).

Mutations :

MUTATIONS	EXON	AMORCES PCR		AMORCES SEQ	TAILLE
		Sens	Antisens biotinisé		
IVS14+1G>A	Intron 14	566	710	565	150 pb
T85C = C29R	2	753	750	358	100 pb
T464A = L155X	5	1055	1036	1058	200 pb
T1679G = I560S	13	594	610	667	204 pb
A2846T = D949V	22	744	1093	356	107 pb

➤ Protocole : PCR en Plaque

Mix **PCR** : Tampon 10 X (5 µL), MgCl₂ 50 mM (2,5 µL), dNTP + UTP 10 mM (1 µL), TAQ Alain 2 (0,5 µL), H₂O qsp 25 µL (16 µL)

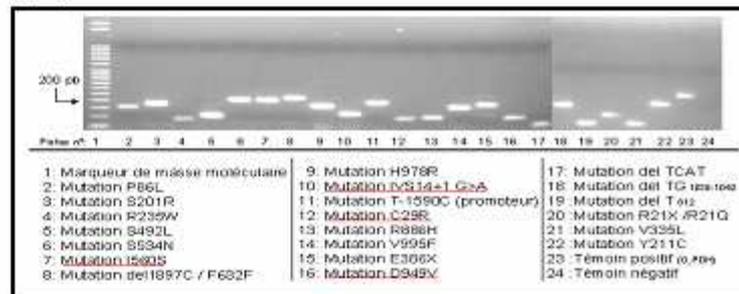
Mix **Amorce** pour la mutation **IVS14+1G>A, D949V** : H₂O qsp 25 µL (23 µL), Amorces 10 µM (1 µL) + 1 µL ADNg (100 ng/µL)

Mix **Amorce** pour la mutation **C29R, I560S, L155X** : H₂O qsp 25 µL (22 µL), Amorces 10 µM (2 µL) + 1 µL ADNg (100 ng/µL)

➤ PCR : Eppendorff Plaque : prog. 41PL

94 °C, 5 min
94 °C, 30 sec
55 °C, 30 sec
72 °C, 1 min
72 °C, 5 min

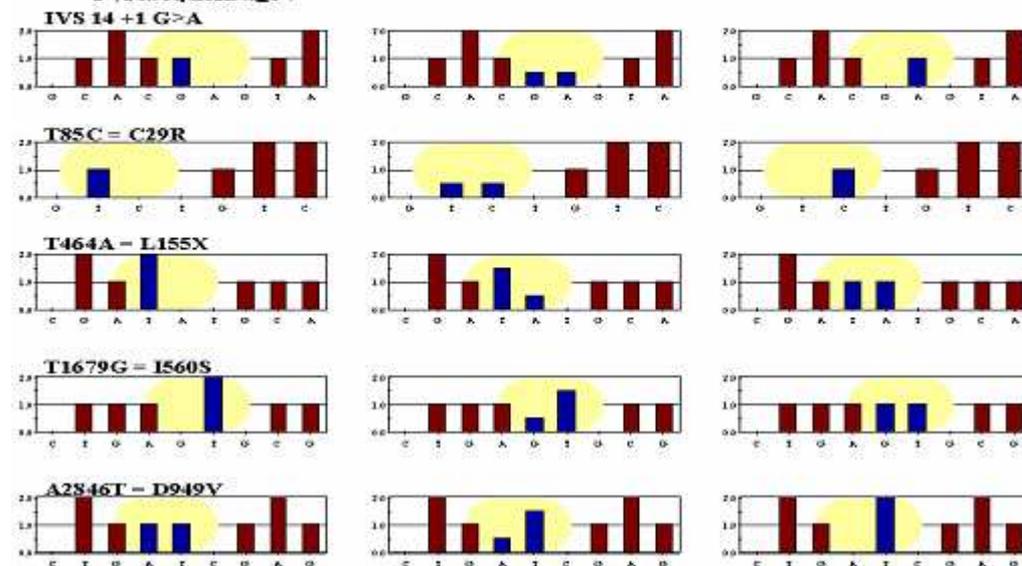
} 35 cycles



➤ Dépôts :

3 µL de PCR
sur gel d'Agarose 1,2%
TBE 1 X

➤ Pyroséquencage :



Annexe 1. Pyroséquencage pour la DPYD.

**CARACTERISATION GENOTYPIQUE POUR LES MUTATIONS
677 C>T ET 1298 A>C de la MTHFR**

➤ **Mutation 677 C>T : Exon 4**
 Amorce sens n° 1115 } **208 pb**
 Amorce antisens biotinylée n° 1125 }

➤ **Mutation 1298 A>C : Exon 7**
 Amorce sens n° 1148 } **202 pb**
 Amorce antisens biotinylée n° 1142 }

➤ **Protocole :**

Mix PCR Tampon 10 X 5 µL
 MgCl₂ 50 mM 2 µL
 dNTP + UTP 10 mM 1 µL
 TAQ Alain 2 0,5 µL
 H₂O qsp 25 µL 16,5 µL

Mix Amorce

H₂O qsp 24 µL 22 µL
 Amorce 10 µM 2 µL
 + 1 µL ADNg (100 ng/µL)

➤ **Témoins :**

Mutation 677 C>T	<i>ADN</i>	<i>Glycérol stock</i>
Sauvage C/C (1/100)	n° 260 - 261	n° 309 - 310
Muté T/T (1/100)	n° 262 - 263	n° 311 - 312 - 359 - 360
Mutation 1298 A>C	<i>ADN</i>	<i>Glycérol stock</i>
Sauvage A/A (1/100)	n° 303 - 304	n° 355 - 356
Muté C/C (1/100)	n° 305 - 306	n° 357 - 358

- **PCR : HYBAID :** prog 49
 94 °C 2 min 30
 94 °C 30 sec
 57 °C 30 sec } 35 cycles
 72 °C 1 min 30
 72 °C 5 min

Eppendorf Plaque : prog. MTHFR

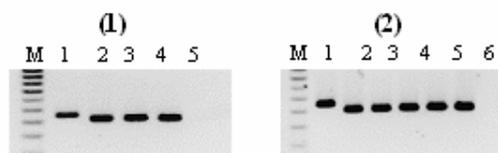
Idem 30 cycles

1. Dépôts :

8 µL de PCR sur gel d'Agarose 1,2% TBE 1 X

C677T (1) 1 : G₃PDH
 2 à 4 : Positifs
 5 : Négatif

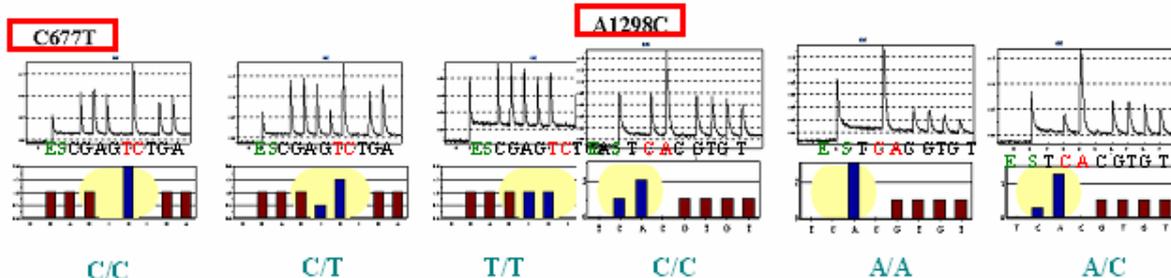
A1298C (2) 1 : G₃PDH
 2 à 5 : Positifs
 6 : Négatif



➤ **Pyroséquençage :**

Mutation C677T : amorce séquence n° 1127 **Entry : C677T Séquence GAG C/T CGA**

Mutation A1298C : amorce séquence n° 1143 **Entry : A1298C Séquence A/C AA GT GT**



Annexe 2. Pyroséquençage pour la MTHFR.

Outre le dépistage de possibles mutations au niveau du gène de la DPYD (approche génotypique), il est réalisé de routine au Centre Paul Papin d'une part un dosage préthérapeutique du rapport UH₂/U (approche phénotypique) pour chacun des patients devant bénéficier d'un traitement par fluorouracile, suivi en cours de traitement d'une adaptation pharmacocinétique de doses permettant ainsi une optimisation du protocole de chimiothérapie au plus près du métabolisme « réel » des patients tout le long de leur traitement.

3.1. Intérêt du rapport UH₂/U.

La méthode « historique » radioenzymatique de mesure de l'activité de la DPYD n'est pas adaptée à une utilisation courante du fait de sa lourdeur et de l'emploi d'un radioisotope. Le dosage urinaire en HPLC (Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance) de pyrimidines naturelles ne permet que le diagnostic de déficit complet et est donc largement insuffisant pour le screening de patients à risque dans une population générale. L'autre possibilité développée dans notre laboratoire a été le dosage de l'uracile plasmatique. Une première étude observationnelle sur 250 patients tendaient à montrer une corrélation entre le taux élevé plasmatique de l'uracile et les risques de survenue d'effets secondaires sévères au 5-FU [161]. Cependant, ce dosage pouvait lui-même être sujet à des variations diverses dont l'alimentation. A donc été mis au point une technique de dépistage des patients par dosage plasmatique (en HPLC avec barrette d'iodes ou LC-MS/MS) à la fois du substrat naturel de la DPYD, l'uracile et de son métabolite, le dihydrouracile (UH₂) (**Figure 32**). Avec cette méthode, il existe une bonne corrélation entre le rapport UH₂/U et à la fois les concentrations plasmatiques à la première cure, la clairance d'élimination du 5-FU et les toxicités observées (**Figure 33**).

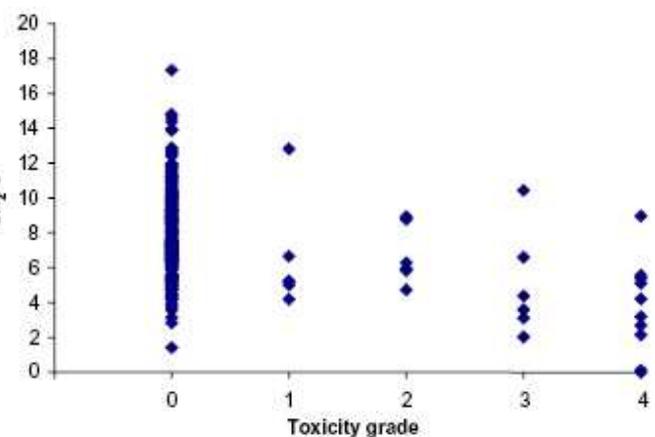
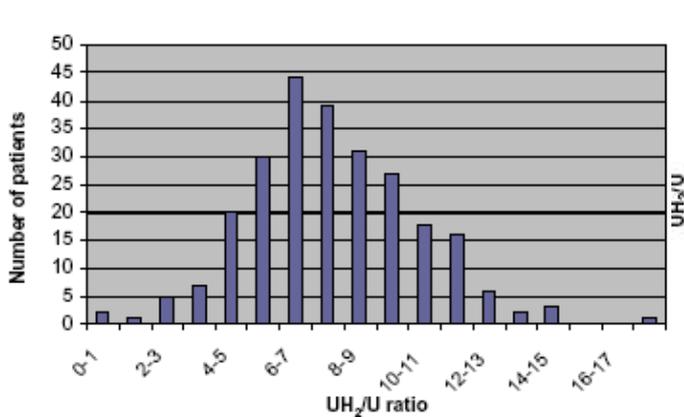


Figure 32. Distribution du rapport UH₂/U.

Figure 33. Corrélation UH₂/U et toxicités.

En combinant les techniques génotypiques et phénotypiques, la détection préthérapeutique d'un déficit enzymatique en DPYD est élevée avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 78% (**Figure 34**).

Respective sensitivity (Se) and specificity (Sp), positive and negative predictive values (P.P.V., N.P.V.) for 2 different values of prevalence, 10% and 20% of the different parameters

Tests	Se (%)	Sp (%)	P.P.V.		N.P.V.	
			10%	20%	10%	20%
Relevant SNP	47.1	98.3	0.75	0.87	0.94	0.88
Uracil	88.2	69.4	0.24	0.42	0.98	0.96
UH ₂ /U ratio	82.4	78.4	0.30	0.49	0.98	0.95
SNP and uracil	47.1	98.7	0.80	0.90	0.94	0.88
SNP or uracil	88.2	69	0.24	0.42	0.98	0.96
SNP and UH ₂ /U ratio	41.2	98.3	0.73	0.86	0.94	0.87
SNP or UH ₂ /U ratio	88.2	78.4	0.31	0.51	0.98	0.96
UH ₂ /U ratio and uracil	76.5	83.6	0.34	0.54	0.97	0.93
UH ₂ /U ratio or uracil	94.1	64.2	0.89	0.95	0.99	0.98
3 Tests (and)	41.2	98.7	0.78	0.89	0.94	0.87
3 Tests (or)	94.1	64.2	0.23	0.40	0.99	0.98

Figure 34. Valeurs des tests en fonction des paramètres étudiés [161].

3.2. Pharmacocinétique du 5-FU.

Tous les protocoles de traitement présentés ici, et quelle que soit l'étude, bénéficient d'une adaptation pharmacocinétique des doses de 5-FU, basée sur sa concentration plasmatique et l'aire sous la courbe, et déterminée à partir d'abaques permettant un ajustement au plus près du profil métabolique du patient, ceci quel que soit le schéma thérapeutique utilisé, l'aire sous la courbe seuil de toxicité ainsi mise en évidence (25 à 30 mg x h/l) restant constante et permettant des extrapolations aux différents traitements [63]. Les posologies de 5 FU sont ainsi adaptées d'une cure à l'autre, en prenant bien sûr également en compte les éventuelles toxicités observées et en visant la zone dite thérapeutique (ZT).

Un tel suivi permet également le calcul de la clairance plasmatique du fluorouracile. Celle-ci peut être abaissée du fait de l'existence d'une diminution de l'activité enzymatique de la DPD qui sera de toute façon systématiquement recherchée mais également via des facteurs épigénétiques mal élucidés (mutations non encore mises en évidence, intervention d'autres mécanismes enzymatiques...).

La formule utilisée pour le calcul de cette clairance est la suivante :

$$\text{Clairance 5 FU [(Lxh)/m}^2\text{]} = \frac{\text{Vitesse de perfusion [(mgxh)/m}^2\text{]}}{\text{Concentration à l'équilibre du 5 FU [mg/L]}}$$

avec Vitesse de perfusion = dose de 5FU (mg/m²) / durée de perfusion (h)

Ainsi la clairance pour le protocole LV5FU2 adapté est de 132,84 ± 43,37

la clairance pour le protocole FUFOL 4h est de 103,4 ± 51,52

Une différence significative a été mise en évidence entre ces deux moyennes par la méthode de distribution de l'écart réduit. **Les patients présentant respectivement dans le protocole LV5FU2 et dans le protocole FUFOL 4h une clairance inférieure à 89,47 (Lxh/m²) [132,84-43,37] et 52,22 (Lxh/m²) [103,4-51,52] sont considérés à risque de toxicité accru au 5-FU.**

3. En conclusion.

L'accès aux différentes techniques, décrites plus haut, offertes par le laboratoire de l'unité INSERN U892, nous a donc permis pendant toute la durée de notre Thèse de pouvoir tester nos hypothèses concernant la pharmacogénétique dans le cadre d'études translationnelles en parallèle et au plus près de nos activités cliniques. De cette expérience, sont issues les différentes publications présentées ci-après, dans la droite ligne - on l'espère -, des divers travaux déjà parus sur le sujet (**voir les Chapitres précédents**). Les résultats souvent complexes et paraissant abscons ramenés à la réalité du terrain, n'en demeurent pas moins des étapes à prendre en compte dans l'optique d'une meilleure prise en charge des cancers colorectaux métastatiques, logique qui sera détaillée dans nos conclusions.

III. TRAVAUX PERSONNELS

C. PREMIERE PARTIE :
5-FLUOROURACILE ET CANCER COLORECTAL
METASTATIQUE

Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité du 5-Fluorouracile dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

1. Présentation du travail et résultats

2. Discussion

3. Publication N°1

Influence of fluorouracile outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A and Gamelin E. Pharmacogenomics J. 2007; Article on line; Epub ahead of print.*

Abstract N° 1 (# 424) and Poster Presentation (Board # 94) at the 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

Récipiendaire d'un Merit Award ASCO 2007

1. Présentation du travail et résultats.

1.1 Rationel.

La prise en compte depuis peu des données pharmacologiques et pharmacogénétiques représentent une voie de recherche récente et probablement majeure en vue de l'optimisation des traitements anticancéreux. Dans le cas du 5-fluorouracile, les études les plus avancées ont concerné la thymidylate synthase (TYMS), la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD). Cependant les résultats très souvent contradictoires (plus de 700 publications concernant la seule TYMS sur PubMed cherchant à évaluer son éventuelle influence sur des schémas de traitements à base de 5-FU !), en terme de réponses et de survies selon les différents polymorphismes, ainsi que le caractère hétéroclite des études justifient la poursuite des recherches dans ce domaine.

Ainsi, si le rôle des polymorphismes génétiques semble acquis dans la prédiction des toxicités, avec notamment la mise en évidence des mutations les plus fréquentes et les plus graves de la dihydropyrimidine déshydrogénase, la situation paraît bien différente dans la recherche de critères prédictifs de réponses. Cela tient à la grande disparité des séries publiées, disparité soulignée dans une méta-analyse récente [162] : Séries souvent de faibles effectifs, très hétérogènes dans les types de maladies étudiées (de la première à la xème ligne,...), les modalités de traitements utilisés (avec ou sans oxaliplatine ou irinotecan) et surtout

comportant des méthodologies très variées de génotypage et de mesures d'expression pour les gènes d'intérêt.

Par ailleurs, une partie de ces résultats contradictoires pourrait découler des possibles différences observées sur le plan génétique entre l'ADN tumoral somatique et l'ADN constitutionnel génomique étudié par exemple sur leucocytes circulants. Car si, du point de vue théorique, la prédiction des toxicité peut être réalisée à partir de ce dernier, la situation est peut-être différente du point de vue de la prédiction des réponses au traitement.

A cet égard, les travaux de Uchida *et al* [163], montrent une incidence élevée de la perte d'hétérozygotie de l'ADN tumoral au niveau du locus de la thymidylate synthase (77%) sur le chromosome 18 par rapport à l'ADN génomique, bien plus importante que celle rapportée habituellement, probablement du fait d'une plus grande sensibilité dans la méthode utilisée (isolement des cellules tumorales par technique de microdissection au laser). Ce travail montre ainsi que l'ADN tumoral ne peut être extrapolé strictement à partir de l'ADN germinale, surtout considérant la TYMS, et que l'isolement même de cet ADN tumoral reste complexe et peut se heurter à des problèmes techniques avec risque de contamination d'ADN germinale issu du tissu péri-tumoral.

La recherche des polymorphismes génétiques à partir d'un simple prélèvement sanguin, utilisée dans notre étude, représente donc une option intéressante dans ce contexte, qui outre le mérite de la simplicité de la technologie mise en oeuvre, repose sur deux rationnels, théorique et pratique :

Théorique, car, bien que les cellules tumorales se distinguent par un haut degré d'instabilité génomique, elles se sont développées à partir d'un génome original dont elles ont gardé un grand nombre des caractéristiques. Ainsi l'étude des gènes impliqués dans le métabolisme du 5-FU, tels que la DPYD et la MTHFR, outre la perte possible d'hétérozygotie du chromosome 18, problème spécifique à la TYMS, reste probablement valide. Par ailleurs, les différences d'activité enzymatique de la TYMS entre la tumeur primitive et ses métastases [164], ainsi que les variations observées de cette activité selon les localisations de ces métastases [165] ne sont pas en faveur d'une étude spécifique de cette enzyme sur tissu tumoral à moins d'obtenir des prélèvements biopsiques systématiques ce qui n'est pas réalisable en pratique courante. Enfin, il semble peu probable que la pression de sélection clonale est privilégiée un génotype de la TYMS induisant une faible activité transcriptionnelle (concrètement le génotype 2R/2R). Ainsi les résultats concernant les génotypes à « haute expression » sur ADN germinale peuvent logiquement *a priori* être considérés comme

« approchants » de la situation au niveau tumoral. En outre les mécanismes complexes de régulation négative de la protéine TYMS sur son propre ARNm [69] doivent probablement « régulariser » (à la hausse) une situation de perte allélique (par perte d'hétérozygotie du chromosome 18) si celle-ci était intervenue au cours du développement clonal.

Il existe par ailleurs *des considérations plus pragmatiques* : l'ADN germlinal est obtenu simplement à partir d'échantillons sanguins ou de cellules de la muqueuse buccale et peut être facilement conservé au froid. L'ARNm est plus adapté à l'étude de la régulation transcriptionnelle mais implique l'utilisation de tissu frais (et donc des biopsies) et d'une technologie de biologie moléculaire "temps-réel" compte-tenu de sa fragilité de conservation. L'étude de la protéine de TYMS est soumise aux mêmes contraintes (avec nécessité de nombreux échantillons) et ne permet d'obtenir que des résultats semi-quantitatifs de l'expression réelle de la TYMS.

Enfin, la conception et la réalisation du travail clinico-biologique présenté ici s'articulent autour de trois objectifs principaux :

- la recherche d'une méthodologie d'analyse génétique à partir d'un simple prélèvement sanguin donc facilement accessible, de faible coût, facilement reproductible, incluant les trois enzymes les plus étudiées dans le cadre de l'activité du 5-FU, ceci couplé à des méthodes pharmacocinétiques de routine.
- L'obtention de résultats pouvant être intégrés dans un futur essai prospectif avec adaptation du traitement dans une population cible.
- la volonté de réaliser une étude sur une population homogène de patients porteur d'un cancer colo-rectal métastatique et bénéficiant exclusivement d'un traitement par 5-FU (évitant tout biais toxicité-efficacité lié aux métabolismes et interaction d'autres molécules cytotoxiques comme l'oxaliplatine ou l'irinotecan) et par perfusion continue, modalité qui cible plus spécifiquement la thymidylate synthase par rapport à un schéma bolus entraînant plutôt l'intégration du 5-FU directement dans les ARNm.

Prenant en compte ces considérations à la fois théoriques (méthodologiques : éviter les biais pour comprendre l'implication des différents polymorphismes) et pratiques (situations courantes de la « vraie vie » où le LV5FU2 est encore largement utilisé), notre étude, quoique rétrospective, s'inscrivait pleinement dans une recherche d'individualisation des traitements de chimiothérapie courante. En outre, il s'agissait du premier travail publié, à notre connaissance et à l'époque, analysant simultanément les impacts thérapeutiques respectifs des polymorphismes de la TYMS, DPYD et MTHFR dans le cadre du cancer colo-rectal métastatique.

1.2. Résultats.

Notre travail rétrospectif monocentrique a donc étudié une population de patients porteurs d'un cancer colo-rectal en situation métastatique sur une période d'environ 7 ans.

76 patients ont été inclus. La moyenne d'âge était de 71 ans, correspondant aux données épidémiologiques de ce type de cancer, avec des extrêmes entre 38 et 88 ans. La quasi-totalité (93%) des patients était en bon état général à l'initiation du traitement. 76% de la population avaient un site métastatique unique qui était dans les $\frac{3}{4}$ des cas de localisation hépatique. Il s'agissait en majorité de première ligne de traitement (83%). Le choix de traitements par 5-FU en perfusion continue (sur 4h ou sur 46h) privilégiait la voie de blocage de la synthèse d'ADN, et était par conséquent plus adapté à des études ciblant la thymidylate synthase.

La répartition du génotype de la région promotrice correspondait aux données de la littérature [166] : 18,4% 2R/2R, 51,3% 2R/3R, 30,3% 3R/3R, le génotype 2R/2R étant le moins représenté dans les populations caucasiennes. **La distribution des génotypes de MTHFR** était en accord avec la loi d'équilibre de Hardy-Weinberg: 9,2% de notre population étaient homozygotes mutés pour 1298 A>C et 10,6% pour 677 C>T. Il n'existait pas de différence significative dans les populations selon le polymorphisme en terme d'âge ou de sexe, avant ou après exclusion des patients à risque de toxicité au fluorouracile, faisant de ces populations des groupes homogènes autorisant les études de comparaison.

En ce qui concerne l'étude des toxicités: 66 évènements toxiques seulement ont été rapportés, le traitement était donc dans l'ensemble très bien toléré d'autant que la grande majorité de ces toxicités étaient de faible gravité (**76% de grade I-II**), essentiellement cutanéomuqueuses (47,5%) dont 22% de diarrhées, 18% de syndrome main-pied et 7,5% de mucite. Les atteintes oculaires sous-évaluées dans la littérature n'étaient pas rares (17%) et

justifiaient d'une prévention par lavages au sérum physiologique préventif. Les nausées-vomissements étaient rares et bien contrôlés, comme la toxicité hématologique. La toxicité cardiaque (6%) correspondait aux données de la littérature sans aucun infarctus du myocarde notifié.

La prise en compte de facteurs prédictifs de toxicité au 5-FU, avec la recherche systématique des quatre mutations les plus fréquentes dans la population caucasienne de la dihydropyrimidine déshydrogénase couplée au calcul de la clairance, a permis d'isoler neuf patients à risque soit **11,8% de la population initiale**. Trois d'entre eux présentaient une mutation connue et six une clairance altérée ce qui sous-tend l'importance des facteurs épigénétiques encore mal élucidés et justifie la combinaison des deux méthodes (génétique et pharmacologique) pour la détection de ces patients. L'incidence importante retrouvée représente ainsi un argument supplémentaire pour cette détection avant tout traitement par 5-FU : 55,6% seulement d'absence ou de faible toxicité (0 ou I) et 33,3% de toxicités sévères (grade III ou IV), et ce malgré des mesures préventives de diminution systématique des posologies et une surveillance clinique stricte.

Il n'a pas été démontré dans notre étude de corrélation entre les grades de toxicités et les différents génotypes du fait de trop faibles effectifs. On pouvait remarquer néanmoins une tendance à des grades de toxicités plus élevés dans les populations homozygotes mutées 677 C>T et 1298 A>C (12,5% et 20% respectivement) sans modification du type clinique de celles-ci.

En régression logistique univariée sur la population générale, les deux variables significatives pour le risque relatif de toxicité étaient un état général altéré (**p=0,004**) et les facteurs de risque tels que définis dans l'étude - à savoir mutations au niveau de la DPYD et baisse du rapport UH2/U - (**p=0,031**), ce qui confortait leurs caractères discriminants. **En analyse multivariée**, la variable mutation 1298 A>C était significative (**p=0,018**) si C/C, confirmant peut-être la tendance exprimée plus haut.

L'étude de la réponse au traitement retrouvait un taux de réponse objective d'environ **33% dont 6,6% de réponse complète**, ce qui correspondait aux taux habituellement observés avec le protocole LV5FU2 et Fufol 8h avec adaptation pharmacocinétique de doses (35%) [8]. Du fait d'effectifs trop faibles, aucun résultat statistique ne pouvait être dégagé des taux de

réponses en fonction des différents génotypes. On pouvait néanmoins noter un net infléchissement des taux de réponse objective dans les populations 3R/3R et expression TYMS “ haute ” ce qui était plutôt en faveur des résultats attendus au vu de la littérature. Par contre, et de façon plus surprenante, on ne retrouvait aucune tendance à une obtention d’une meilleure réponse en cas de mutations doubles alléliques de MTHFR ; on observerait même plutôt paradoxalement un effet délétère (diminution des réponses objectives et réponses complètes nulles). **L’analyse en modèle univarié** était non contributive.

La survie globale médiane était de **20 mois** (IC 95% [440j; 900j]) sur la population étudiée sans facteur de risque. **Le taux était de 5% de survie à 5 ans** ce qui correspondait aux données épidémiologiques. L’état général altéré (PS 2-3) (**p=0,03**), l’âge > 75 ans (**p=0,034**) et un marqueur ACE anormal (**p<0,0001**), à l’initiation du traitement étaient des facteurs de mauvais pronostic. Il n’existait pas de différence significative quant au sexe et au type de traitement. Les génotypes “ haute ” ou “ basse ” expression de la TYMS, ou selon les mutations de la MTHFR n’étaient pas discriminants.

Par contre, la comparaison des courbes de survie globale entre la population 3R/3R et la population porteur d’au moins un allèle 2R était hautement significative (**p=0,0066**): Médiane à 270 jours (IC 95% [163 ; 603]) et 844 jours (IC 95% [550 ; 984]) respectivement.

Partant de ce constat et du rôle connu de la MTHFR sur le taux intracellulaire de folates (et donc sur la modulation d’activité du 5FU), nous avons cherché à isoler une population qui nous semblait la plus à risque de survie globale plus courte: La combinaison 3R/3R pour la TYMS et sauvage pour MTHFR 1298 A>C ou 677 C>T versus tout autre génotype (**Figure 15 de l’article rapporté**). La médiane de survie était retrouvée à 283 jours (IC95% [163; 603]) pour cette population contre 842 jours (IC95% [515; 984]) pour l’autre. La différence était hautement significative (**p=0,0065**). Cette population ainsi isolée (16 patients sur 67 = 23,9% soit presque un quart de la cohorte étudiée) semblait donc bien à risque “ d’événement décès ” précoce et pourrait faire l’objet, compte tenu de sa fréquence, d’une prise en charge spécifique dans le cadre d’une étude prospective.

En analyses uni et multivariées, les deux variables significatives étaient l’âge supérieur à 75 ans (à pondérer du fait des biais possibles) et un PS élevé (**p=0,010 et p=0,008**). Les différentes analyses en stratifiant sur les variables d’intérêt (les génotypes) n’étaient pas contributives, les effectifs étant trop faibles.

La survie sans progression était de **100 jours** pour la population globale et non informative pour les différents génotypes.

2. Discussion

Notre étude était la première étudiant simultanément les génotypes de la DPYD, de la TYMS (polymorphisme de la région promotrice et mutation G>C de découverte alors très récente) et de la MTHFR sur une population de 76 patients porteurs d'un cancer colo-rectal métastatique et recevant un traitement uniquement par fluorouracilee et acide folinique.

Cette population était homogène en terme d'âge, d'état général et de sexe. Le traitement était bien toléré avec peu d'évènements toxiques rapportés (66 en tout dont 76% de grade I-II). Le taux de réponse objective était d'environ 34,3%. La médiane de survie globale était de 20 mois et celle de survie sans progression de 100 jours après exclusion de 9 patients à haut risque de toxicité (p=0,031 en analyse univariée) au 5-FU (33,3% de grade III-IV malgré les précautions thérapeutiques) du fait de mutations connues de la DPYD ou de facteurs épigénétiques avec clairance anormalement basse.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence un intérêt dans la recherche de la mutation G>C de la TYMS tant dans les toxicités que dans les réponses et survies mais notre étude comprenait un faible effectif de patients. Les homozygotes mutés C/C pour la mutation MTHFR 1298 A>C étaient à risque de toxicités sévères en analyse multivariée (p=0,018).

Les critères cliniques tels que l'état général et l'âge, ou des marqueurs biologiques anciens comme l'ACE restaient des facteurs pronostiques forts et valides.

Nous avons également montré qu'une analyse pharmacogénétique sur leucocytes circulants permettait de façon simple et reproductible d'isoler une population présentant un mauvais pronostic sur la survie globale (3R/3R pour la TYMS et homozygote sauvage pour 1298 A>C ou 677 C>T de la MTHFR), population qui pourrait justifier d'une prise en charge thérapeutique différente : traitement intensifié d'emblée ou augmentation des posologies de l'acide folinique par exemple.

En effet, et au-delà des considérations purement statistiques portant sur la recherche d'interaction entre survies, toxicités et polymorphismes du métabolisme du 5-FU, l'intérêt d'une telle étude portant sur un traitement largement utilisé comme le LV5FU2 (5-FU modulé par l'acide folinique) était de permettre d'appréhender au mieux la nécessité ou non de l'associer à des molécules plus récentes comme l'irinotecan ou l'oxaliplatine, et ce en situation clairement palliative.

Encore à l'heure actuelle, le schéma « simplifié » LV5FU2 est en effet loin d'être « dépassé », y compris avec l'avènement des thérapies ciblées. Cela pour plusieurs raisons :

1. **En situation adjuvante**, il reste un traitement de référence par rapport au FOLFOX-4 des essais MOSAIC (européen) et NSBP-C07 (américain), dans les situations de sujets à risques (sur le plan général et/ou neurologique), d'état général médiocre ou d'âge > 70 ans comme l'ont récemment souligné, certes avec certaines limites méthodologiques, les résultats de l'étude QUASAR, grande étude anglaise de phase III ayant inclus plus de 3200 patients dont environ 20% étaient âgés de plus de 70 ans : le bénéfice global observé après chimiothérapie adjuvante sur la réduction significative du risque de récurrence [HR=0,78], et sur le risque de décès [HR= 0,82], n'était pas observé dans le sous-groupe de patient de 70 ans et plus ([HR=1,13]) pour le risque de rechute comme pour le risque de décès [HR = 1,02] ; ainsi, et dans ces situations, le protocole LV5FU2 est comparable en terme de survie sans récurrence qu'un schéma plus agressif combinant l'oxaliplatine.
2. **En situation métastatique**, le schéma LV5FU2 a été récemment « réactualisé » par trois études de phase III multicentriques randomisées dans les situations métastatiques dont les possibilités d'opérabilités sont d'emblée inenvisageables. Ces trois études ont cherché à démontrer l'intérêt de thérapies séquentielles : l'étude FOCUS (anglaise), l'étude CAIRO 1 (hollandaise) et l'étude FFCD 2000-05 (française), évaluant donc une monochimiothérapie par 5-FU/Acide folinique suivie d'une thérapie combinée versus une thérapie combinée d'emblée. Il s'agit d'une stratégie « crescendo » dont le but est de débiter par une fluoropyrimidine orale ou IV et de n'intensifier le traitement que lorsque la maladie n'est plus contrôlée. Dans le cas de l'étude CAIRO 1, il s'agissait de capécitabine suivie d'irinotecan, suivi de Xelox versus une stratégie de type capécitabine-irinotecan (Xeliri), suivi de Xelox chez 820 patients [167]. L'essai FOCUS comportait trois stratégies : monothérapie avec 5-FU, suivie d'irinotecan, monothérapie suivie d'une chimiothérapie combinée, stratégie combinée d'emblée [168]. L'étude FFCD a le schéma le plus simple avec une chimiothérapie de type LV5FU2, suivie de FOLFOX-4, suivie de FOLFIRI versus une chimiothérapie combinée d'emblée par FOLFOX-4, suivie de FOLFIRI, suivie de capécitabine ou autre traitement dont du

cetuximab pour les derniers patients inclus [169]. Finalement, l'ensemble de ces études ne montre aucun bénéfice en faveur de la chimiothérapie combinée d'emblée, ce qui justifie, au moins pour certains patients, l'attitude thérapeutique consistant à débiter une monothérapie en situation de première ligne métastatique sans perte de chance pour le patient (Figure 35).

Essai	Traitement séquentiel	Traitement combiné	p
FOCUS [6]	13,9	B-Ir 15,0	IC : 0,79-1,03
FOCUS [6]	13,9	B-Ox 15,2	IC : 0,85-1,11
FOCUS [6]	13,9	C-Ir 16,7	IC : 0,73-0,96 p = 0,01
FOCUS [6]	13,9	C-Ox 15,4	IC : 0,81-1,06
CAIRO	16,3	17,4	IC : 0,79-1,08
FFCD 2000-05	17	17	IC : 0,84-1,32
	Monothérapie	Chimiothérapie combinée	
Douillard [2]	14,1	17,4	p = 0,031
De Gramont [1]	14,7	16,2	p = 0,12

Abréviations : B-Ox : stratégie B avec oxaliplatine soit monothérapie par 5FU puis Folfox, B-Ir : stratégie B avec irinotécan soit monothérapie par 5FU puis Folfiri, C-Ox : stratégie C avec oxaliplatine soit Folfox puis Folfiri, C-Ir : stratégie C avec irinotécan soit Folfiri suivi de Folfox.

Figure 35. Résultats des différentes études évaluant une stratégie séquentielle versus combinée (Médianes de survie globale en mois). A titre indicatif, sont indiqués les résultats d'études princeps avec l'oxaliplatine (De Gramont et al. [13]) et l'irinotecan (Douillard et al. [93]).

Considérant ces dernières remarques, il apparaît ainsi intéressant d'intégrer pleinement dans la pratique courante les résultats de notre étude pour, par exemple, sélectionner des patients pouvant bénéficier d'un schéma intensifié d'emblée dans une situation purement palliative (puisque'on le démontrera plus loin, l'irinotecan comme l'oxaliplatine « lissent » en quelque sorte les facteurs de mauvais pronostic liés aux polymorphismes des enzymes impliqués dans le métabolisme du 5-FU), ou d'autres qui, au contraire, pourraient pleinement tirer bénéfice en terme de survies comme de qualités de vie d'un traitement simplifié par 5-FU modulé par l'acide folinique. De même, des patients « limites » (1N+ par exemple, ou avec un PS=2) pour la mise en place d'un protocole FOLFOX-4 en adjuvant pourraient bénéficier d'un traitement par LV5FU2, bien moins toxique s'ils présentent des facteurs prédictifs de bon pronostic concernant l'efficacité d'un schéma basé exclusivement sur le 5-Fluorouracile. On le voit sur ces exemples, le retentissement de résultats de pharmacogénétique sur la pratique clinique peut être majeur pour le malade comme pour le thérapeute.

3. Publication N°1.



The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer

O Capitain, M Boisdron-Celle,
A-L Poirier, S Abadie-Lacourtoisie,
A Morel and E Gamelin

Department of Medical Oncology and Clinical
Pharmacology, INSERM U564 Centre Paul Papin,
Centre Régional de Lutte Contre le Cancer,
Angers, Cedex, France

Correspondence:

Professor E Gamelin, Department of Clinical
Pharmacology, CRLCC Paul Papin, INSERM
U564, 2 Rue Moll, Angers 49933, France.
E-mail: e.gamelin@unimedia.fr

The purpose of this study was to determine simple genetic factors helpful to tailor 5-FU administration and determine strategy in first-line chemotherapy of advanced colorectal cancer. In 76 patients initially treated by 5-FU, thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and methylene tetrahydrofolate reductase germinal polymorphisms, dihydrouracil/uracil plasma ratio and 5-FU plasma clearance were investigated and correlated for tolerance (10.5% grade 3 and 4 toxicity) and efficacy (32.9% objective response rate and 20 months median overall survival time). Toxicity was linked to performance status > 2 ($P = 0.004$), low UH_2/U ratio, 2846 A $>$ T, IVS 14 + 1G $>$ A for *DPD* ($P = 0.031$), and homozygoty C/C for *MTHFR* 1298 A $>$ C ($P = 0.0018$). The overall survival of the patients with a 3R/3R *TS* genotype associated with C/C for 677 C $>$ T or A/A for 1298 A $>$ C was statistically shorter (log-rank test $P = 0.0065$). Genetic factors permit the tailoring of 5-FU treatment. They should occupy center stage in future clinical trials for specifically designing treatment for patients with a given biologic feature.

The Pharmacogenomics Journal advance online publication, 14 August 2007;
doi:10.1038/sj.tj.6500476

Keywords: colorectal cancer; fluorouracil; thymidylate synthase; dihydropyrimidine dehydrogenase; methylene tetrahydrofolate reductase

Introduction

Over the past few years, a central goal of research in oncology has been to determine main molecular biomarkers that could predict response and toxicity to chemotherapeutic agents.

Indeed, the understanding of interindividual heterogeneity in efficacy and toxicity could serve as a rational basis for tailored treatment (optimal drug therapy and dosage for each patient) as opposed to an empirical 'one-size-fits-everybody' chemotherapy. In this domain of a cancer pharmacogenetic approach, intense efforts have especially focused on fluorouracil and on its metabolic enzymes.

5-fluorouracil (5-FU) has been widely used for almost 50 years in the treatment of solid malignancies, especially in colorectal cancer (CRC) both in advanced and adjuvant settings.

Its main target is thymidylate synthase (TS), a key enzyme in cell proliferation, which is inhibited by the active metabolite, fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP).

Received 20 March 2007; revised 20 June
2007; accepted 6 July 2007

In patients with metastatic disease, response rates are below 20% with 5-FU monotherapy and go up to 25% simply by adding folinic acid, leucovorin (5-formyltetrahydrofolate), a precursor of the methyl donor 5–10 methylenetetrahydrofolate (CH_2FH_4).¹ Indeed, the complex between TS and FdUMP is stabilized in an inactive ternary form by CH_2FH_4 .² Clinical studies have clearly demonstrated the interest of this association allowing improved TS inhibition.³

Despite the improved response rates with the addition of oxaliplatin or irinotecan, 5-FU remains a major drug in treatment of CRC.⁴ However, many questions persist such as: how can we enhance the response rate and efficacy in terms of survival? How can we improve tolerance, knowing that treatment efficacy is correlated to the 5-FU dose, but dose-intensification strategies increase toxicity? Moreover, these toxic side effects, around 20–25% grade 3 and 4 events with current 5-FU regimens and 0.2% toxic deaths often occur in patients in adjuvant situations; many of them are either already cured by surgery before chemotherapy, 30% in pT3N1 and 70% in pT3N0 stages, or can receive no benefit from treatment.

To answer these questions, several new approaches are under investigation, such as pharmacogenomics, by analyzing tumor tissue, with microarrays, for example. The problem with pharmacogenomics is the generally high number of genes requiring bioinformatic study that does not make it technically suitable for routine work.

Another research approach is pharmacogenetics that focuses on the effects of polymorphisms (especially single-nucleotide polymorphisms (SNPs)) in drug-metabolizing enzymes and in drug targets. It could enable the discovery of the best-tolerated and most effective treatment strategies

by the study of the hereditary basis for interindividual differences in drug response. In our study, we decided to focus on three previously studied enzymes involved in fluorouracil metabolism and activity (Figure 1).

TS is the primary target. It catalyzes the reductive methylation of dUMP by CH_2FH_4 to form dTMP which is a critical reaction for cell proliferation. The TS gene on chromosome 18 contains a unique 28-bp tandem repeat sequence (called 'R') within the enhancer region (TSER) and within the 5'-untranslated region. The three most common genotypes in the Caucasian population (2R/2R, 2R/3R and 3R/3R) have been identified.⁵ This tandem repeat sequence appears to function as an enhancer element on transcription as well as on translation of TS mRNA with an increasing number of repeat sequences.^{6,7} Despite certain contradictory results, most clinical studies have documented the growing evidence that the TS genotype is associated with clinical efficacy in terms of response and survival to 5-FU-based chemotherapy.^{8–11} Moreover, a common SNP has been recently identified at the 12th nucleotide of the second repeat in the 3R allele within a USF family E-Box consensus element. This SNP could abolish USF-1 binding and decrease *in vitro* transcriptional activity.^{12,13} From these experimental observations, Kawakami *et al.*⁷ classified each patient in 'Low' or 'High' TS expression in accordance with the combination of this SNP and TSER genotypic status (Table 1). Two clinical studies showed a correlation between this combination and overall survival (OS) (significantly longer in the low expression group).^{12,14}

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the key enzyme involved in the catabolic breakdown of 5-FU. It is submitted to a common genetic polymorphism and its activity displays wide interindividual variability from 8- to 21-fold.^{15–16} Low enzyme activity leads to excessive amounts of active metabolites and consequently to severe adverse events, hematopoietic, neurological and gastrointestinal, sometimes combined in a polyvisceral toxic syndrome, potentially fatal in 0.2% of cases. In the global population, 3% of individuals are heterozygous and at risk of adverse toxic events. To date, around 30 mutations on chromosome 1p associated with reduced DPD activity have been reported. For example, the most prominent DPD polymorphism is a G > A SNP in the GT 5'-splice recognition site of intron 14 that leads to skipping exon 14 and the synthesis of an inactive truncated protein with severe DPD deficiency.

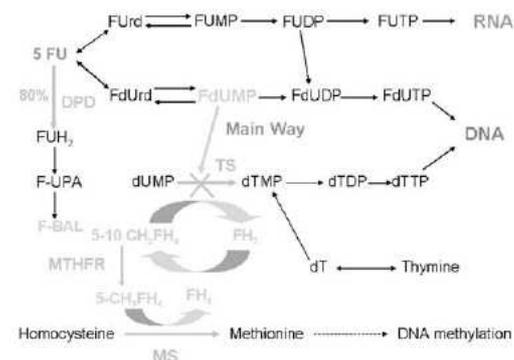


Figure 1 5-FU metabolic pathways. 5-FU, 5-fluorouracil; 5–10 CH_2FH_4 , 5–10 methylenetetrahydrofolate; 5- CH_3FH_4 , 5-methyltetrahydrofolate; FH_4 , tetrahydrofolate; dUMP, deoxyuridine 5'-monophosphate; dTMP, deoxythymidine 5'-monophosphate; dTDP, deoxythymidine 5'-diphosphate; dTTP, deoxythymidine 5'-triphosphate; FdUMP, fluorodeoxythymidine 5'-monophosphate; FUR, fluorouracil; FdR, 5-fluorodeoxyuridine; F-BAL, 5-fluoro- β -alanine; DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase; TS, thymidylate synthase; MS, methionine synthetase.

Table 1 Classification following Kawakami *et al.*⁷ in 'Low' or 'High' TS expression in accordance with the combination of SNP and TSER genotype status

'High' expression	'Low' expression
2R/2R	2R/3Rg
2R/3Rc	3Rc/3Rg
3R/3Rc	2Rg/3Rg

Abbreviations: CR, complete response; SNP, single-nucleotide polymorphism; TS, thymidylate synthase; TSER, thymidylate synthase enhancer region.

Methylene tetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) controls the intracellular CH_2FH_4 concentration. It converts CH_2FH_4 into 5-methyltetrahydrofolate and represents a key enzyme in the folate metabolism at the crossroads between DNA synthesis and DNA methylation via methylation of homocysteine to methionine. *MTHFR* is also subject to several common polymorphisms on chromosome 1p. To date, 44 SNPs have been individualized. Among these, 37 are correlated with severe enzyme activity deficiency (inferior to 20%) and hyperhomocysteine. The *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C are the most common (15 and 12%, respectively, for homozygotes)¹⁷ and homozygous mutated genotypes are associated with lower enzyme activity (a decrease of 75% for 677 C>T and 30% for 1298 A>C). However, an accumulation of intracellular CH_2FH_4 is observed which could enhance the efficacy of 5-FU treatment by stabilization of the ternary complex with TS and FdUMP. This concept was clearly demonstrated both in experimental studies and in clinical settings.^{18–23}

The purpose of this study was to analyze the correlation between *TS*, *DPD* and *MTHFR* germinal polymorphisms on efficacy and toxicity of fluorouracil and leucovorin chemotherapy in patients with advanced CRC. Our objective was to provide a tool for physicians to determine before treatment patients at risk of 5-FU toxicity or resistance. To our knowledge, this study is the first that analyzes these three enzymes in a homogeneous population. We determined these different polymorphisms with usual biomolecular techniques, associated with the determination of fluorouracil clearance and a study of uracil and dihydrouracil (UH_2/U) plasma ratios as described previously.²⁴ The genetic polymorphism analysis was carried out from a simple peripheral blood sample that represents an interesting and easy non-invasive approach for molecular profiling. Finally, we evaluated the tolerance to and efficacy of fluorouracil treatment.

Results

Clinical data and frequencies of genotypes

A total of 76 patients who fulfilled the inclusion criteria were studied. The median follow-up of the study was 1264 days (3.5 years) with 7.7–85 months (7 years) as the range. The clinical data of these patients are provided in Table 2. The median age was 71-years old and 93.4% of patients had a good performance status, that is lower than 2. The sex ratio was 1.5/1 male/female. The site of metastasis was unique in 76% of the cases and then in 75% of cases in the liver. These clinical characteristics were in agreement with epidemiological data concerning advanced CRC.

In our study, 83% of patients were treated in first-line therapy.

Table 3 lists the distribution of *TS*, *DPD* and *MTHFR* gene polymorphisms. This distribution was similar with data previously described in a Caucasian population:^{5,16,17,20} 18.4% for 2R/2R, 9.2% for *MTHFR* 1298 C/C, 10.6% for *MTHFR* 677 T/T, and 3.9% for *DPD* polymorphism hetero-

Table 2 Patients' initial characteristics

Clinical data	Number of patients (%)
<i>Gender</i>	
Male	46 (60.5)
Female	30 (39.5)
<i>P5</i>	
0–1	71 (93.5)
2–3	5 (6.5)
<i>Age</i>	
Median (years)	71.2
Range (years)	39–88
<i>Tumor site</i>	
Colon	55 (72.5)
Rectum	21 (27.5)
<i>Metastatic site</i>	
Liver	44 (58)
Lung	4 (5.3)
Peritoneal	5 (6.5)
Carcinomatosis	
Nodes	5 (6.5)
Number of sites > 1	18 (23.5)
<i>Treatment regimen</i>	
LV5FU2	31 (41)
Fufol 4 h	45 (59)
First line of treatment	63 (83)

zygotes. Moreover, these genotype frequencies were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium and populations with different polymorphisms are homogeneous with respect to age, performance status and gender.

Correlation between polymorphisms and toxicity

The different types of toxicity are described in Table 4. Sixty-six adverse events (87.9% grade 1 and 2 side effects) were notified, especially skin and gastrointestinal (47.5% in total): mucositis (7.5%), diarrhea (22%) and hand-foot syndrome (18%). Conjunctival irritation was not rare (17%) but often not much described in previous clinical data although it impaired the quality of life. The incidence of hematological events was low (only 3%). Finally, the incidence of cardiac toxicity was 6% but without constituted myocardial infarction.

With the tailored regimens using pharmacokinetic monitoring, the fluorouracil-based chemotherapy was well tolerated (only 10.5% grade 3 and 4 toxic side effects) and no toxic death was noted.

Among 76 patients of this prior study, nine patients (11.8% of the overall population) were isolated because of a high risk of fluorouracil toxicity. These nine patients presented abnormally low clearance levels of fluorouracil

Table 3 Distribution of *TS*, *DPD* and *MTHFR* polymorphisms in the studied population (76 patients)

	Number of patients	Frequency (%)
<i>TS</i> polymorphisms		
2R/2R	14	18.4
2R/3R	39	51.3
3R/3R	23	30.3
<i>TS</i> expression		
'High'	50	65.8
'Low'	26	34.2
<i>MTHFR</i> 1298 A>C		
A/A	40	52.6
A/C	29	38.2
C/C	7	9.2
<i>MTHFR</i> 677 C>T		
C/C	32	42.1
C/T	36	47.3
T/T	8	10.6
<i>DPD</i>		
2846 A>T	2	2.6
IVS 14 + 1G>A	1	1.3

Abbreviations: *DPD*, dihydropyrimidine dehydrogenase; *MTHFR*, methylene tetrahydrofolate reductase; *TS*, thymidylate synthase.

Table 4 Distribution of the toxic side effects in the population of patients (76 patients)

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total (n)
Mucositis	2	2	0	1	5
Conjunctivitis	4	7	0	0	11
Diarrhea	5	8	2	2	17
Hand-foot syndrome	5	7	0	0	12
Cardiac	0	3	1	0	4
Hematologic	0	1	1	0	2
Nausea	2	3	0	0	5
Alopecia	0	1	0	0	1
Asthenia	4	4	1	0	9
Total (n)	22	36	5	3	66

associated with an abnormal UH₂/U plasma ratio: two patients were heterozygous A/T for 2846 A>T, one for IVS 14 + 1G>A and six without *DPD* SNP (epigenetic factors or SNP still unknown). In this population, nine toxic events were described, with 33.3% (and up to 66% for *DPD* heterozygosity) grade 3 and 4 gastrointestinal events, in spite of pharmacological adjustment and clinical observation. Concerning toxicity, a significant difference ($P=0.048$, Fisher's test) was found between the populations with (nine patients) and without a risk factor (67 patients).

Multivariate analysis of clinical and biological parameters for predicting toxicity according to the Cox-regression

Table 5 Multivariate analysis of clinical and biological parameters for predicting toxicity according to the Cox-regression model

	Odds ratio (95% CI)	P
Performance status 2–3	57.74 (3.70 ; 901.25)	0.004
2846 A>T, IVS14+1G>	6.20 (1.18; 32.56)	0.031
A low clearance of 5-FU		
Age>75 years	0.08 (0.005; 1.09)	0.058
<i>MTHFR</i> 1298 A>C		
A/A	1.00 (ref)	0.056
A/C	2.54 (0.30; 21.47)	0.393
C/C	25.99 (1.76; 384.32)	0.018

Abbreviations: CI, confidence interval; *MTHFR*, methylene tetrahydrofolate reductase.

model is shown in Table 5. Fluorouracil toxicity was significantly linked to performance status >2 with 60% grade 3 and 4 events ($P=0.004$), low clearance and heterozygosity for *DPD* ($P=0.031$), and homozygosity C/C for *MTHFR* 1298 A>C ($P=0.0018$) with 30% grade 3 and 4 toxic events.

Correlation between polymorphisms and response

The global objective response (OR) (complete response plus partial response (PR)) rate was 32.9 with 6.6% of complete response (CR).

We considered the 'high risk for toxicity' patients as a possible bias for the efficacy study (because of inadequate dosage, toxic side effects leading to delayed treatment, bias between *DPD* SNPs and *TS/MTHFR* SNPs for interpretation of results). Consequently, the following studies (correlation between genotypes and response or survival) were analyzed on 67 patients after the exclusion of the nine with 5-FU low clearance and there was no difference for response rates (34.3% for OR and 7.4% for CR) in this new studied population.

The distribution between response rates and the different genotypes is shown in Table 6. No significant link was noted. However, the OR for 3R/3R was decreased by almost 50% in comparison with other *TSER* genotypes, as described in previous clinical studies. OR in the 'High *TS* expression' population also decreased with only 24 against 40.5% in the 'Low' group (not significant). Likewise, no variable was significant in multivariate analysis of biological parameters for predicting response to fluorouracil treatment.

Correlation between polymorphisms and survival

Among 67 patients, the OS rate was 5% at 5 years (Figure 2) in agreement with clinical data from the literature. The median OS time was 20 months. The median progression-free survival (PFS) time was 100 days. The log-rank analysis according to clinical characteristics was significant, with a longer survival for performance status <2 ($P=0.03$) and an age younger than 75-years old ($P=0.034$).

Table 6 Comparison of responses between the different genotypes in population without risk factors (67 patients)

	Objective response (%)	Stability/ progression (%)
<i>Polymorphism TS</i>		
2R/2R (n = 11)	36.4 (n = 4) CR = 18, 2 (n = 2)	63.6 (n = 7)
2R/3R (n = 35)	42.9 (n = 15) CR = 8, 6 (n = 3)	57.1 (n = 20)
3R/3R (n = 21)	19.0 (n = 4) CR = 0 (n = 0)	81.0 (n = 17)
<i>Expression TS</i>		
'Low' (n = 42)	40.5 (n = 17) CR = 11, 9 (n = 5)	59.5 (n = 25)
'High' (n = 25)	24.0 (n = 6) CR = 0 (n = 0)	76.0 (n = 19)
<i>MTHFR 677 C>T</i>		
C/C (n = 28)	46.4 (n = 13) CR = 10, 7 (n = 3)	53.6 (n = 15)
C/T (n = 31)	22.3 (n = 7) CR = 6, 5 (n = 2)	77.4 (n = 24)
T/T (n = 8)	37.5 (n = 3) CR = 0 (n = 0)	62.5 (n = 5)
<i>MTHFR 1298 A>C</i>		
A/A (n = 37)	37.8 (n = 14) CR = 8, 1 (n = 3)	62.2 (n = 23)
A/C (n = 25)	32.0 (n = 8) CR = 8, 0 (n = 2)	68.0 (n = 17)
C/C (n = 5)	20.0 (n = 1) CR = 0 (n = 0)	80.0 (n = 4)

Abbreviations: CR, complete response; *MTHFR*, methylene tetrahydrofolate reductase; *TS*, thymidylate synthase.

Univariate analysis for OS time according to *TSER* genotypes was not significant and curves crossed (Figure 3). However, OS medians were very different among *TSER* polymorphisms: 669, 900 and 270 days for 2R/2R, 2R/3R and 3R/3R, respectively. The log-rank test was highly significant after gathering 2R/3R and 2R/2R versus 3R/3R ($P = 0.0066$).

No difference was found between OS time and 'High' or 'Low' *TS* expression with two superposable curves (Figure 4). Likewise, there was no difference between OS or disease-free progression survival times and the studied *MTHFR* genotypes (677 C>T and 1298 A>C).

However, the OS rate of the patients with the 3R/3R *TS* genotype associated with C/C for 677C>T or A/A for 1298A>C (16 patients (23.8%)) was much statistically shorter than that of the patients with another genotype (log-rank test $P = 0.0065$) (Figure 5). The OS medians were 283 (95% CI (163; 603)) and 842 days (95% CI (515; 984)), respectively. There was no statistical difference between these populations of 16 patients and the others in respect to age, performance status and gender.

No variable, except age ($P = 0.10$ if older than 75-years old, but with a possible bias such as death by another cause than

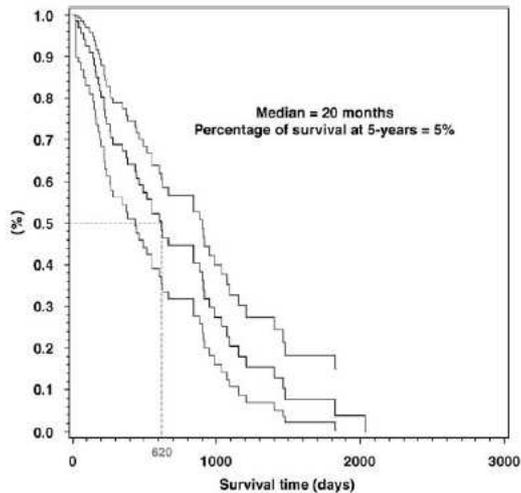


Figure 2 Kaplan-Meier curve with confidence interval (CI) at 95% for overall survival (76 patients).

cancer) or performance status ($P = 0.0008$ if ≥ 2), was significant in uni- or multivariate analysis for OS or PFS according to the Cox-regression method.

Discussion

New targeted drugs have transformed the treatment of advanced CRC but the median OS is about 24 months in the absence of metastasis surgery, and 5-FU remains the cornerstone of the combinations. Furthermore, after previous clinical trials that showed an improved survival with combinations, recent multicentric randomized clinical trials comparing one versus two drugs in first-line therapy presented in abstract form showed no substantial difference in OS and treatment duration in the combined group, and on the contrary a more important toxicity.²⁵⁻²⁸ Clearly, these recent results pose both the problem of the choice of the drugs and that of their combination. Thanks to tremendous progress in molecular biology, several promising genomic or genetic prognostic factors have been reported and could be useful but treatment strategies are still based on large clinical trials and translational studies are still ancillary. The purpose of this study was to simultaneously characterize the impact of pretherapeutically determined genetic and epigenetic factors on 5-FU tolerance and efficacy and based on the relevant factors to provide physicians with some tools to decide between one drug versus combined therapy in first line and to tailor 5-FU treatment.

To our knowledge, this is the first study analyzing the impact of both *TS*, *DPD* and *MTHFR*, the three main enzymes of 5-FU activity and metabolism, on its tolerance

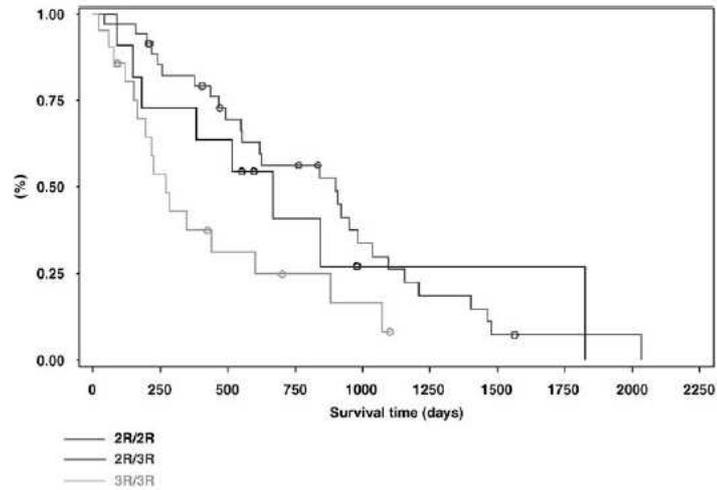


Figure 3 Univariate overall survival of patients according to TSER genotypes.

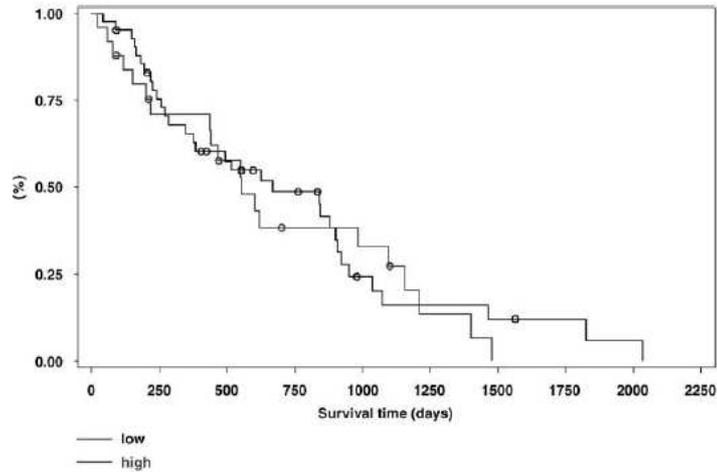


Figure 4 Univariate overall survival of patients according to low and high TS expression genotype. TS, thymidylate synthase.

and its efficacy in a homogeneous population of patients treated with a 5-FU and leucovorin combination for advanced CRC.

Indeed 5-FU, the most commonly used anticancer agents, provoke 20–25% grade 3 and 4 toxic side effects and 0.2–0.5% toxic deaths to patients under treatment while many of them are in an adjuvant setting, especially for colon cancer, and potentially cured after surgery.⁴ Individual 5-FU dose management based on a pharmacokinetic follow-up

permits us to reach the best therapeutic index but it does not prevent very early acute toxic side effects due to *DPD* deficiency and chronic toxicities such as dacryocystitis, mainly due to *TS* polymorphism. Thus, in this study, the two regimens of treatment using pharmacokinetic monitoring as previously described were well tolerated in an elderly population with a median age of 71 years. However, 10.5% of grade 3 and 4 toxic events were observed. Concerning the metabolic pathway of 5-FU, we found that with the

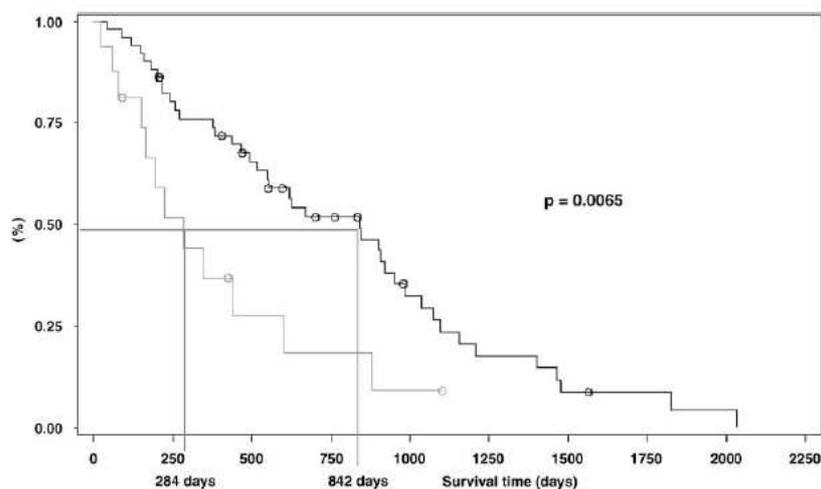


Figure 5 Univariate overall survival of patients according to 3R/3R TS and A/A for MTHFR 1298 A>C or 3R/3R TS and C/C for MTHFR 677 C>T genotypes (16/67 patients=23.9%) (gray line) and other genotypes (black line). MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; TS, thymidylate synthase.

pretherapeutic detection, 9 of the 76 patients were at high risk of 5-FU toxicity because of a DPD deficiency, revealed by a very low pretherapeutic UH₂/U plasma ratio.²⁴ Two of them were heterozygous A/T for 2846 A>T, one for IVS 14+1G>A, the main deleterious variants of the DPD gene. The six other patients had no DPD variant detected in the 23 that were analyzed. In these nine patients, nine very early toxic events were described, with 33.3% grade 3 and 4 gastrointestinal events in spite of pharmacological adjustment and clinical observation. This percentage of grade 3 and 4 adverse events reached 66% for the three patients with DPD variants. Thus, for early toxicity, a significant difference was found between populations with and without metabolic risk factors. Clearly, a pretherapeutic detection of DPD deficiency would have permitted the avoidance of these adverse events with an initial reduction of the 5-FU dose followed by individual dose management. Besides, some patients had an accelerated 5-FU metabolism due to an enhanced DPD activity that follows a Gaussian curve in the population.¹⁵ These patients would benefit from intensified doses of 5-FU.

Likewise, patients whose MTHFR 1298 A>C genotype was C/C were significantly at higher risk of toxicity as well ($P=0.018$).

On the other hand we focused on efficacy. The OR rate was 32.9%, with 6.6% of complete responses in monotherapy, and the median OS and PFS were 20 and 3.3 months, respectively.

In terms of response, we found that the OR rate for 3R/3R was decreased by almost 50% in comparison with other TSER genotypes, as described in previous clinical studies. Likewise, although statistically not significant, the OR rate

was 24% versus 40.5% in 'High' compared with 'Low' TS expression.

We found no difference between OS and TS expression in contradiction with previously described results^{12,14} but interestingly we found that an OS rate of 28% for the whole population of patients, sharing 3R/3R TS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C was significantly far shorter than that of patients with another genotype, regardless of its kind ($P=0.0065$). Figure 5 shows the striking difference between the two curves, with a median survival rate of 283 versus 842 days, respectively. The other major interest of this finding is that clearly the OS rate of this population of patients remained poor despite the second-line combined therapy with oxaliplatin or irinotecan. Thus, an initial intensified first-line therapy, with a targeted therapy would probably have been of interest.

These results, both in terms of tolerance and efficacy, have a crucial impact on clinical practice. First, indeed, from a simple blood sample taken before chemotherapy, physicians can be warned of a high risk of severe or even life-threatening toxicity for a patient, that is relevant DPD and/or MTHFR variants regardless of the 5-FU regimens and the type of cancer.^{23,29} Taking into account the wide use of 5-FU and other fluoropyrimidines, this is of major interest. In practice, in cases of a DPD deficiency, either 5-FU dose management based on a pharmacokinetic follow-up can be proposed after a reduced first dose of 5-FU or the switch to another drug, such as raltitrexed.²⁹ In the case of MTHFR 1298 A>C homozygote variant, the toxicity is not due to a metabolic deficiency. Then a 5-FU dose reduction could be useful but might impact the efficacy. Thus, a much closer

follow-up will be proposed and a dose reduction at the very beginning of a relevant adverse event.

Besides, the question of the one or two even three drugs in first-line therapy remains unresolved, except in case of selected patients, such as those with potentially resectable or curable liver and/or lung metastatic disease. For the other ones, who represent the majority of the patients, intensification has not clearly proved its superiority in terms of OS and has shown an increased frequency of toxic side effects.^{27,28} Pharmacogenomics and pharmacogenetics could help the clinician to decide whether or not he has to intensify the chemotherapy regimen. As such, the detection of 3R/3R *TS* genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C, is a major predictive factor of failure to 5-FU and of a very short survival rate. It obviously requires an immediately intensified combination with another cytotoxic drug such as oxaliplatin or irinotecan and a targeted therapy, such as an anti-VEGF or an anti-EGFR.^{8,14,18–22} Intensification using one or two additional drugs with different metabolism pathways could restore the efficacy. Marcuello *et al.*¹⁴ suggested that a combined regimen with irinotecan or oxaliplatin could reduce the predictive value of the *MTHFR* genotype in contradiction to other previous studies with 5-FU alone.^{19,20,21,23} No results have been reported with both *TS* and *MTHFR* genotypes.

On the contrary, the other *TS* and *MTHFR* genotypes are predictive of very long survival with 5-FU plus folinic acid alone, and pose the question of the interest of intensified and combined protocols. Actually, except for some patients who could benefit from early metastasis surgery and need an immediate intensified chemotherapy, the question remains of the initial combination and the risk of toxic side effects. This is of major importance in the adjuvant setting. Undoubtedly, the FOLFOX regimen has statistically improved the cure rate compared with LV5FU2 in patients with pT3N1 colon cancer.³⁰ However, oxaliplatin provokes severe chronic neuropathy in 18–20% of patients that leads to a prolonged and sometimes irreversible functional impairment and alters the quality of life. Moreover, this protocol is now extended to pT3N0 patients whose risk of recurrence is 30%. Obviously, some patients would benefit from 5-FU plus folinic acid only and the screening for 3R/3R *TS* genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C could help to detect patients free of these poor prognosis molecular factors.

Over the past few years, intensive efforts have focused on the problem of prognostic factors, both in terms of tolerance and efficacy. Our results confirm the interest for the detection of genetic factors such as *TS*, *DPD* or *MTHFR* polymorphisms and their potential impact in clinical practice. We have shown that this adjustment can be performed routinely using both simple biomolecular techniques and pharmacokinetic monitoring and therefore these factors should be used in future trials for tailoring therapy and design specifically the treatments for patients with a given biologic feature.

Materials and methods

Patients

This retrospective study included 76 patients treated for advanced CRC with two different regimens, weekly or every 2 weeks, but including only fluorouracil and leucovorin. To be eligible for inclusion, patients had to be over 18-years old, present measurable metastatic lesions, and have a life expectancy of at least 3 months. It was a first line of treatment for 83% of patients, and a second or more line of treatment for 17%. All patients were required to have normal bone marrow and organ functions (particularly cardiac function) before the administration of fluorouracil. Performance status was evaluated as defined by the World Health Organization (WHO). Written informed consent was obtained from all patients before taking peripheral blood samples for biomolecular analysis. A computed tomography scan was performed before the beginning of treatment and metastatic lesions were measured.

Chemotherapy regimen description

Two regimens of 5-FU plus leucovorin were administered, either by a weekly 4-h 5-FU continuous infusion (FUFOL 4h) through a battery-operated pump after 100 mg/m² intravenous bolus of leucovorin, or every 2 weeks 46-h so-called LV5FU2 ('de Gramont' tailored regimen) after 200 mg/m² intravenous bolus of leucovorin and 400 mg/m² bolus of 5-FU.^{4,31} The initial dose was 1200 or 2500 mg/m², respectively. Previous studies showed a significant relationship between 5-FU area under curve (AUC) in plasma and on one hand tolerance and on the other hand efficacy and a targeted AUC of 25 mg h l⁻¹ had been determined, suitable to different kinds of 5-FU infusions.³² Thus, 5-FU dose was tailored to reach this AUC using pharmacokinetic monitoring as described previously.³³ Briefly, 5-FU individual dose management was performed weekly or bi-weekly based on 5-FU steady-state plasma concentrations measured at the previous administration, at 3 h for weekly 5-FU or 43 h infusion for LV5FU2 and guided by a dose-adjustment chart.³² Treatment was continued until progression was documented. Then, a second-line therapy combining 5-FU to oxaliplatin or irinotecan was proposed.

Follow-up

Every week or every 2 weeks, a physical examination was performed and toxic adverse events were evaluated and graded. Treatment efficacy was evaluated by comparing metastatic lesion measurements before and after 3 months then every semester. Data were collected until the death of the patient or until the study's date point (1 December 2004).

Assessment of response

The response was assessed according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Group Criteria and in reviewing computed tomography scans. The OS was defined by the period between the date of diagnosis and the date of death regardless of the cause or point date. PFS was defined by the

period between the date of diagnosis and the date of progression (clinical, biological or radiological progression) or death.

Assessment of tolerance

All adverse events, especially gastrointestinal events, mucositis, hand-foot syndrome, conjunctival irritation, and leukopenia were recorded and graded for severity according to WHO scales. Hemograms were performed every week, and ionograms, urea, creatinine and liver enzyme tests every 2 weeks.

In the event of significant grade 2 toxicity, and without pharmacokinetic recommendations for a decrease, the dose was reduced by 10%. In cases of grade 3 toxicity, the treatment was interrupted until toxic manifestations were resolved and restarted with a decrease of 25%. Treatment was stopped in cases of grade 4 toxicity.

Fluorouracil clearance

5-FU clearance was systematically calculated for each patient, especially since a low clearance can possibly be linked to unknown epigenetic factors that enhance the risk of toxicity.

This clearance was calculated by the following pharmacological formula:

$$\text{Fluorouracil clearance } [(l \times h) / m^2] = \frac{\text{Continuous infusion speed } [(mg \times h) / m^2]}{\text{Steady-state FU concentration } [mg/l]}$$

with continuous infusion speed = 5-FU dose (mg/m²) / infusion period (h). Thus 5-FU clearance for 'tailored LV5FU2' regimen was 132.84 ± 43.37 L × h/m² and 5-FU clearance for 'FUFOL 4h' regimen was 103.4 ± 51.52 L × h/m². Using the reduced difference distribution method, patients with FU clearance below 89.47 (l × h/m²) (132.84 ± 43.37) for 'tailored LV5FU2' and inferior to 52.22 (l × h/m²) (103.4 ± 51.52) for 'FUFOL 4h' were considered as having a high risk of toxicity.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure.³⁴

Determination of TSER polymorphism. For the analysis of the 28-repeat polymorphism, a fragment containing the repeats was amplified using the two following primers: Forward primer was determined after research on Primer 3 Output[®] - CGCGGAAGGGGTCCTGC- and reverse primer as previously described by Kawakami *et al.*⁷ -TCCGAGCCGGCCACAGGCAT-.

Expected fragment sizes were 108 bp for 2R and 136 bp for 3R. In each case, PCR tests were run on HYBAID in a 50 µl final volume containing 1 µl of genomic DNA (100 ng/µl), 5 µl buffer 10 ×, 3 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl dNTPs, 0.4 µl Taq Polymerase, 2.5 µl DMSO (for final 5% volume), 1 µl of each specific forward and reverse primer (10 µM) and 34.1 µl H₂O.

After 35 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 60 s, and extension at 72°C for 1 min), amplification products were electrophoresed in 1 × TBE on agarose gel at 2% with ethidium bromide 1 × (0.5 µg/µl) (Figure 6).^{12-14,21}

Determination of G>C SNP. For the determination of G>C SNP within the second repeat in the 3R allele, restriction-fragment length polymorphism analysis was used. Briefly, amplification products for 3R/3R or 2R/3R genotypes were purified using the QIAquick system kit (Qiagen, Courtabeuf, France) using the selective binding properties of a silica-gel membrane. According to provided buffers, impurities were washed away and the pure DNA was eluted during centrifugation (13 000 tr/min). Purified products (30 µl) were digested with the *Hae*III (Sigma, Lyon, France) restriction enzyme (GGCC restriction site) for 150 min in the presence of buffer 2 (4 µl for a final concentration 1 ×). Finally, digested PCR products were loaded into adjacent lanes on a 3% agarose gel containing ethidium bromide 1 × and electrophoresed in 1 × TBE (Figure 7).^{12-14,21}

Determination of DPD and MTHFR polymorphisms. The analysis of *DPD* and *MTHFR* polymorphisms was based on pyrosequencing technology (bioluminometric real-time sequence determination).

For *DPD* polymorphisms, four SNPs were systematically analyzed: IVS 14 + 1G>A within intron 14, 2846 A>T within exon 22, 1679 T>G within exon 13 and 464 T>A

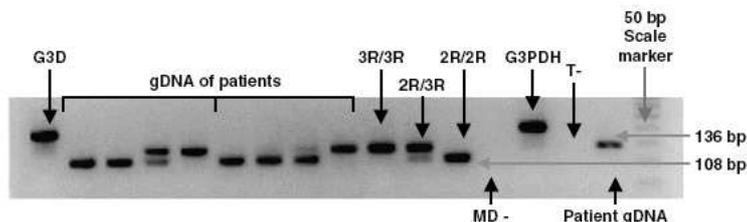


Figure 6 Thymidylate synthase enhancer region (TSER) analysis by PCR. Products can be separated in 1 × TBE on 2% gel electrophoresis with ethidium bromide 1 × (0.5 µg/µl). Sizes of different fragments are indicated on the right (fragments of 136 bases pairs (bp) and 108 bp corresponding to 3R and 2R, respectively). *G3PDH* = glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase (gene constitutively expressed in cells). *G3D* = *G3PDH* with dimethylsulfoxide (DMSO). MD - = negative marker with DMSO.

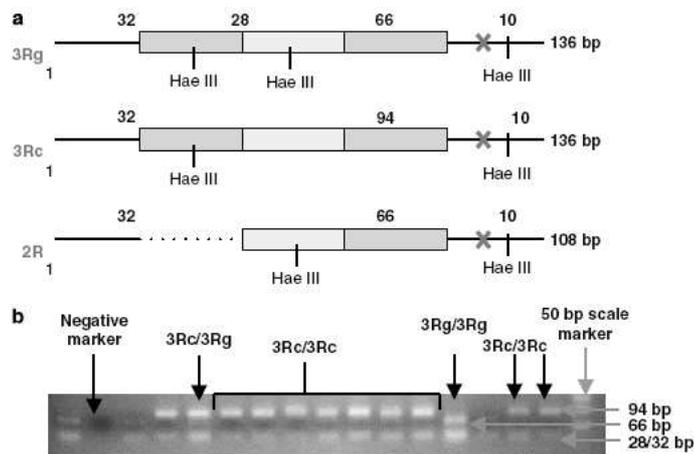


Figure 7 *HaellI* restriction map of TS tandem repeat fragments produced in the RFLP analysis. (a) This map shows the *HaellI* restriction sites within the fragments produced by PCR. ATG codon is indicated by the red cross. Theoretical different sizes (bases pairs) of the DNA fragments produced after digestion with *HaellI* are shown. An *HaellI* restriction site within the second repeat of the 3R allele is removed with G → C SNP. Thus digestion allows for screening of this SNP. (b) Finally, digested PCR products were loaded into adjacent lanes on a 3% agarose gel containing ethidium bromide 1 × and electrophoresed in 1 × TBE. For each patient, the genotype was analyzed. RFLP, restriction-fragment length polymorphism; TS, thymidylate synthase.

Table 7 *DPD* and *MTHFR* pyrosequencing. Primers used for biotinylated PCR and annealed primers used for bioluminometric real-time sequence determination

	SNPs	Exon	PCR primers 5' → 3'		Annealed primers	Size (pb)
			Forward	Biotinylated reverse		
<i>DPD</i>	IVS14+1G > A	Intron 14	atcagtgagaaaacggctgc	taaacattcaccaactatgcca	aggctgactttccaga	150
	464 T > A	5	ttatggagctgctaagatga	atcacatacctcagtagcaaa	ccattaatattggt	200
	1679 T > G	13	aatatggagcttccgttct	gagagaaagtttgggtgagg	ccagccaccagcacatcaa	204
	2846 A > T	22	aagcactgcagtaacctggaa	tcattgtagcattaccacagttga	gcaagttgggtatga	107
<i>MTHFR</i>	677 C > T	4	tattggcaggttacccaaa	ctcactggatgggaaagat	agaaggtgtctgcgg	208
	1298 A > C	7	gccaggggaatcctctt	ctccagcatcactcacttgt	ggagctgaccagtgaag	202

Abbreviations: CR, complete response; *DPD*, dihydropyrimidine dehydrogenase; *MTHFR*, methylene tetrahydrofolate reductase enzyme; SNP, single-nucleotide polymorphism.

within exon 5, a nonsense mutation recently individualized in our research unit.^{35,36}

These SNPs are associated with severe *DPD* deficiency and a potential life-threatening toxicity under a 5-FU regimen.

For *MTHFR* polymorphisms, the two most common SNPs in the Caucasian population were analyzed: 677 C > T and 1298 A > C.²⁰⁻²³

For each polymorphism, a prior biotinylated PCR with specific primers (Table 7) was performed. Briefly, DNA simple strands were obtained by the purification of the biotinylated PCR products with Sepharose balls coupled to streptavidine and after denaturation with washing in different baths (ethanol 70%, then NaOH 0.2M and finally washing buffer pH 7.6 which washed away unbiotinylated

products). These purified DNA simple strands were the target templates for sequencing by synthesis. Indeed the sequential addition of nucleotides (dNTP) into the growing DNA chain from an annealed primer was complementary to these target templates and each incorporation of dNTP by DNA polymerase led to the release of a pyrophosphate (Ppi). This Ppi was converted by ATP sulfurylase into ATP serving as a substrate for Luciferase enzyme. The produced light was detected as evidence of nucleotide incorporation and was translated as an on-screen pyrogram. Pyrosequencing data (pyrogram) for each patient were then compared to theoretical patterns and the genotype was easily identified (Figure 8).

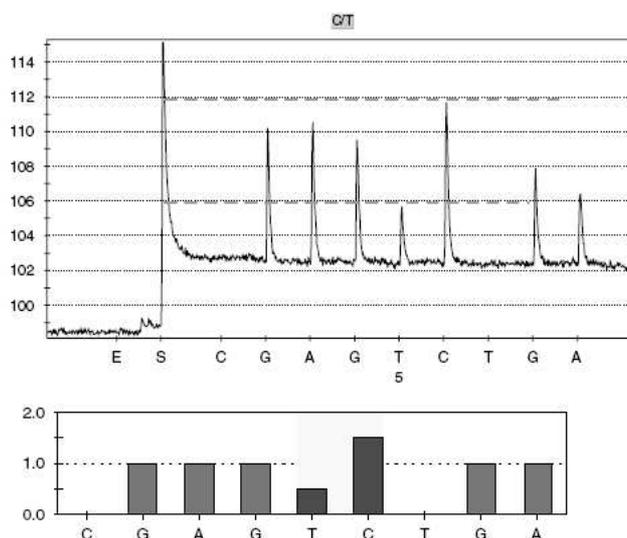


Figure 8 Example of pyrogram (up) and pattern (down) for MTHFR 677 C>T heterozygote. MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase.

Statistical analysis

Statistics were performed using SPSS software (Chicago, IL, USA). χ^2 test and Fisher's exact test were used for comparison of different frequencies. The α -error risk was classically chosen as 5%. Kaplan-Meier estimates and log-rank test were employed in univariate analysis of OS and PFS.

The Cox-regression method was used for toxicity risk multivariate analysis. The same method was used for response to FU-based treatment or OS and PFS multivariate analysis.

Acknowledgments

We would like to thank the Comité Départemental du Maine et Loire de la Ligue Contre Le Cancer and the Rotary club of Angers for their financial support.

Duality of interest

The authors declare that they have no duality of interest.

References

- 1 Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate (see comments). *J Clin Oncol* 1992; **10**: 896-903.
- 2 Pinedo HM, Peters GFJ. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988; **6**: 1653-1664.
- 3 Poon MA, O'Connell MJ, Wieand HS, Krook JE, Gerstner JD, Tschetter LK et al. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin : confirmatory evidence of improved efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 1967-1972.

- 4 de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 808-815.
- 5 Marsh S, Collie-Duguid E, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999; **58**: 310-312.
- 6 Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; **20**: 191-197.
- 7 Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 4096-4101.
- 8 Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; **1**: 65-70.
- 9 Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2832-2843.
- 10 Iacopetta B, Grieco F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2001; **85**: 827-830.
- 11 Popat S, Matakidou A, Houlston R. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 529-536.
- 12 Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; **63**: 6004-6007.
- 13 Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene

- abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63: 2898–2904.
- 14 Marcuello E, Altes A, Del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112: 733–737.
 - 15 Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 1993; 53: 5433–5438.
 - 16 Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N et al. Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2248–2253.
 - 17 Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and Whites. *Cancer Epidemiology* 2002; 11: 1611–1621.
 - 18 Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kimi YI. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 134–144.
 - 19 Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1611–1615.
 - 20 Etienne MC, Formento JL, Chazal M, Francoual M, Magne N, Formento P et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 1–8.
 - 21 Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1365–1369.
 - 22 Lu JW, Gao CM, Wu JZ, Sun XF, Wang L, Feng JF. Relationship of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and chemosensitivity to 5-fluorouracil in gastric carcinoma. *Chinese J Cancer* 2004; 23: 958–962.
 - 23 Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 835–840.
 - 24 Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1105–1110.
 - 25 de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938–2947.
 - 26 Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1041–1047.
 - 27 Seymour MT. Fluorouracil, oxaliplatin and CPT11 use and sequencing (MRC FOCUS): a 2135-patient randomized trial in advanced colorectal cancer. The UK NCRI colorectal clinical studies group. *J Clin Oncol* 2005; 23(suppl 16S): 250S (abstr 3518).
 - 28 Bouché O, Castaing M, Etienne PL et al. Randomized strategical trial of chemotherapy in metastatic colorectal cancer (FFCD 2000-05): Preliminary results. *Am Soc Clin Oncol* 2007; 1805 (Abstr 4069).
 - 29 Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Morel A, Gamelin E. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett* 2007; 249: 271–282.
 - 30 André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickist T et al. Multicenter international study of oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer (MOSAIC) investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343–2351.
 - 31 Gamelin E, Boisdron-Celle M. Dose-monitoring of 5-fluorouracil in patients with colorectal or head and neck cancer. Status of the art. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30: 71–79.
 - 32 Gamelin E, Danquechin-Dorval E, Dumesnil Y, Maillard PJ, Goudier MJ, Butin PC et al. Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU. *Cancer* 1996; 77: 441–451.
 - 33 Gamelin E, Boisdron-Celle M, Delva R, Regimbeau C, Caillex PE, Alleaume C et al. Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1470–1478.
 - 34 Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 16: 1915.
 - 35 Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2895–2904.
 - 36 Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Laine-Cessac P, Gamelin E. Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with a lethal outcome following 5-fluorouracil administration and the determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clin Biochem* 2007; 40: 11–17.

4.1. Abstract N° 1 (# 424) ASCO GI 2007.

Influence of 5-fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer.

Sub-category:

Translational research

Category:

Colon and Rectum

Meeting:

2007 Gastrointestinal Cancers Symposium

Abstract No:

424

Author(s):

O. Capitain, M. Boisdron-Celle, A. Poirier, P. Soulié, P. Maillart, A. Morel, E. Gamelin

Abstract:

Introduction: 5-fluorouracil (5-FU) remains the corner stone of the treatment of CRC. Over the past few years, 3 enzymes implicated in fluorouracil metabolism and activity have been especially studied: thymidylate synthase (TS), dihydro pyrimidine dehydrogenase (DPD), and methylene tetra hydro folate reductase (MTHFR). The purpose of this study was to determine whether the response, overall survival and toxicities were associated with TS, DPD and MTHFR gene germinal polymorphisms. **Methods:** The study included a retrospective analysis of 76 patients with metastatic CRC and treated with LV5FU2. Genomic DNA was isolated in peripheral blood. The double polymorphism of TS, i.e. a 28-base pair tandem repeat sequence within the 5'-untranslated region with a single nucleotide polymorphism was analysed. DPD SNPs (IVS 14 + 1G>A, 2846 A>T, 1679 T>G and 464 T>A) and MTHFR SNPs (677 C>T and 1298 A>C) were investigated. 5-FU clearance associated with dihydrouracil/uracil plasma was also studied. Statistical analysis used Khi2 test, linear regression analysis and Kaplan-Meier method. **Results:** Populations with different polymorphisms were homogeneous with respect to age, performance status and gender. Treatment was well tolerated: 66 toxic events with 58 graded 1-2 and 8 graded 3-4. The overall response rate was 34.3%, the median overall survival and median progression-free survival median times were 20 months and 100 days respectively. C/C patients group for MTHFR 1298 A>C or heterozygous group for DPD were at a higher risk of toxicity ($p=0.018$ and $p=0.031$). The overall survival time of the patients with 3R/3R TS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298A>C (16 patients = 23.8%) was statistically shorter than that of the patients with another genotype (log-rank test $p=0.0065$). **Conclusions:** To our knowledge, this study is the first one analysing both DPD, TS and MTHFR polymorphisms in homogeneous cohort of patients with advanced colorectal cancer treated only with 5-FU and leucovorin. Those results suggest from a simple blood sample the ability of an easy discrimination to determine patients at high risk of toxicity or patients with a shorter survival. In the future, a tailored treatment for these populations will be designed.

III. TRAVAUX PERSONNELS

D. DEUXIEME PARTIE :
IRINOTECAN ET CANCER COLORECTAL
METASTATIQUE

Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité de l'irinotecan dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

1. Présentation du travail et résultats

2. Discussion

3. Publication N° 2

Influence of pharmacogenetic polymorphisms on 5-fluorouracile and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer.

Capitain O, Asevoaia A, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Maillart P, Morel A, and Gamelin E. *Soumis à publication..*

Abstract N°2 (# 429) and **Poster Presentation (Board # 41)** at the 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

4. Abstract N°3 (# 2140)

Pharmacokinetic and pharmacogenic approach to improve dose intensity and tolerance of FOLFIRI + Cetuximab in patients with metastatic CRC. Capitain O, Metges JP, Adenis A, Raoul JL, Lecomte T, Lam YH, Faroux R, Masliah C, Berger V, Gamelin E.

Poster Presentation at the 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

5. Abstract N°4 (# 2120)

Impact of PI3K, BRAF and KRAS mutations on efficacy of intensified FOLFIRI plus cetuximab regimen in advanced colorectal cancer. Linot B, Capitain O, Metges JP, Adenis A, Raoul JL, Paintaud G, Poirier AL, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E.

Poster Presentation at the 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology (Orlando, Florida, USA).

1. Présentation du travail

1.1 Rationnel.

Notre premier travail, initié pendant notre année de Master 2, nous a donc permis de montrer qu'une analyse pharmacogénétique sur leucocytes circulants permettait de façon simple et reproductible d'isoler une population présentant un mauvais pronostic sur la survie globale

(3R/3R pour la TYMS et homozygote sauvage pour 1298 A>C ou 677 C>T de la MTHFR), population qui pourrait justifier d'une prise en charge thérapeutique différente tant en situation adjuvante (préférer un schéma par LV5FU2 par rapport au schéma plus toxique qu'est le FOLFOX, notamment chez des sujets âgés par exemple porteur d'un génotype de bon pronostic), qu'en situation métastatique dans les cas où la résecabilité est inenvisageable : un schéma intensifié avec irinotecan ou oxaliplatine pourrait être alors plutôt préféré en cas de génotype de mauvais pronostic concernant la TYMS et la MTHFR, à l'option de schémas séquentiels (LV5FU2 ou capecitabine suivi de FOLFOX4 ou FOLFIRI) ayant montré - mais sans évaluation des thérapies ciblées dans ce contexte -, des résultats comparables en termes de survies quel que soit le bras de traitement [167-169].

Fort de l'intuition de certains auteurs, comme Marcuello *et al.* [170], évoquant l'idée que des régimes de traitements combinant 5-FU/Acide folinique en association avec l'irinotecan ou l'oxaliplatine, pouvaient en quelque sorte « lisser » les facteurs génétiques liés au métabolisme du 5-FU, ce qui pourrait, au moins en partie, expliquer les résultats contradictoires observés dans la littérature, nous avons cherché à explorer cette hypothèse sur une population homogène de patients présentant un cancer colorectal métastatique sous traitement par FOLFIRI. Nous avons ainsi pu rechercher d'éventuelles corrélations entre DPYD, TYMS, MTHFR et UGT 1A1, avec les taux de réponses et les survies sans progression et globale. De plus cette étude, présentée ici et soumise à publication, nous a permis d'évaluer les résultats obtenus d'un tel schéma de traitement dans notre institution par l'utilisation systématique de l'adaptation individuelle de doses de 5-FU via les techniques de pharmacocinétique. Enfin, il était intéressant de considérer le statut de l'UGT 1A1 pour confirmer ou non les résultats déjà publiés sur la tolérance clinique et hématologique de l'irinotecan (aucune réduction de dose n'avait été effectuée en cas de génotype UGT 1A1*28 homozygote).

1.2. Résultats.

Notre travail rétrospectif monocentrique a donc étudié une population de patients porteurs d'un cancer colo-rectal en situation métastatique sur une période allant d'octobre 1999 à Aout 2005. **90 patients ont été inclus.** Le suivi médian était de 3 ans environ. La moyenne d'âge était de 64,5 ans, correspondant aux données épidémiologiques, avec des extrêmes entre 23 et 82 ans. La quasi-totalité (95,5%) des patients était en bon état général à l'initiation du

traitement. 80% de la population avaient un site métastatique unique qui était dans les ¾ des cas de localisation hépatique. Il n'existait majoritairement pas d'atteinte hépatique biologique, notamment la bilirubine était normale dans tous les cas. Il s'agissait en majorité de première ligne de traitement (93,3%), sauf 6 patients traités en deuxième ligne après un schéma par FOLFOX4. 81,2%, 38,3% et 14% des patients ont bénéficié d'une seconde, troisième et quatrième ligne respectivement. Le schéma FOLFIRI a été réintroduit en troisième ou quatrième ligne chez 8% des patients. 75% de la population étudiée a reçu un schéma FOLFOX4 en seconde ligne, 32% une monothérapie par 5-FU (IV ou per os) et finalement 11,2% une ou plusieurs thérapies ciblées pendant le séquentiel de traitement qui a suivi le protocole FOLFIRI.

La répartition du génotype de la région promotrice correspondait aux données rapportées habituellement dans la littérature notamment 24,4% 2R/2R pour la TYMS. Pour les autres génotypes étaient décrits 8,9% pour le statut 1298 C/C et 11,1% pour le statut 677 T/T de la MTHFR. Des mutations ont été retrouvées chez 3 patients concernant la DPYD et 13,4% de la population étudiée présentaient un syndrome de Gilbert (homozygotie pour l'UGT1A1*28). Une différence significative concernant l'âge et l'état général entre les populations selon le polymorphisme a été retrouvée (PS pour l'UGT 1A1 et âge pour la TYMS), et prise en compte par la suite pour les recherches statistiques de corrélations entre les différents génotypes et les réponses/toxicités observées. Ceci enfin de ne pas introduire de biais par interférence entre des données cliniques habituellement corrélées à un impact sur les réponses et les survies (comme le Performance Status ou l'âge), et la stricte influence des différents génotypes.

En ce qui concernait l'analyse des toxicités: 289 *évènements toxiques* ont été rapportés, dont 91,3% de faible grade 1-2. 8,7% de toxicités sévères de grade 3-4 ont été notés, sans décès. Ces effets secondaires étaient essentiellement des diarrhées (14,2% dont 5 de grade 3 et malgré traitement par lopéramide à haute posologie), et de l'asthénie (25,6%). Les nausées-vomissements étaient bien contrôlés, 11,7% de grade 1-2, sous traitement antiémétique à base de sétrons. Concernant la toxicité hématologique, 2,8% seulement de neutropénies de grade 3-4 ont été rapportées.

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les différents effets secondaires rapportés et les génotypes de la TYMS ou de la MTHFR, contrairement à notre étude précédente (**Publication n°1**). Chez les 3 patients présentant une mutation hétérozygote de la DPYD, et

après baisse initiale de dose de 50% puis adaptation pharmacocinétique, une neutropénie de grade 4, et des diarrhées de grade 1-2 ont été notées. Enfin dans la population homozygote pour l'UGT 1A1*28 (7/7) - 12 patients -, un taux d'évènements toxiques de 26,2% était retrouvé (dont 2 syndromes diarrhéiques de grade 3 et 3 neutropénies de grade 4).

En analyse univariée, ces toxicités étaient statistiquement liés au statut UGT 1A1 *28 7/7 (avec un risque relatif de 3,3) sans atteindre toutefois la significativité ($p=0.058$, OR 3.4; 95% CI, 0.74 to 15.6). Par contre aucune différence n'était retrouvée avec les génotypes 6/7 et 6/6.

L'étude de la réponse au traitement retrouvait un taux de réponse objective d'environ **42,3% dont 7,8% de réponse complète**, ce qui correspondait aux données habituellement rapportées avec ce type de protocole. Aucun résultat statistiquement significatif en analyse univariée n'a pu être dégagé des taux observés de réponses et en fonction des différents génotypes. On pouvait néanmoins noter un net infléchissement des taux de réponse objective dans la population UGT 1A1 *28 7/7 (16,7% comparés aux 40 à 50% pour les autres génotypes) avec un p égal à 0,054 (Test de Pearson), très proche donc de la significativité.

La survie globale médiane était de **27,4 mois** et le temps médian de **survie sans progression de 7 mois**. Le taux était de 10% de survie à 5 ans, cohérent avec les données actualisées de la littérature. L'état général altéré (PS 2-3) ($p=0,001$) et l'âge > 75 ans ($p=0,031$) à l'initiation du traitement étaient sans surprise des facteurs de mauvais pronostic. Les patients hétérozygotes A/C pour MTHFR 1298 A>C avaient une survie globale statistiquement plus courte en uni comme en multivarié ($p=0,04$ et 0,01 respectivement) par rapport aux autres génotypes, sans qu'une explication puisse être apportée. Par contre et contrairement à notre précédente étude, le génotype de la TYMS n'était pas significativement lié à la survie globale. Concernant le statut UGT 1A1, il semblait exister une tendance négative sur la survie en cas de syndrome de Gilbert (non significatif), par rapport aux autres génotypes. Le statut hétérozygote UGT 1A1 6/7 semblait, lui, au contraire de bon pronostic sur les courbes de survies construites selon le test de Logrank (tendance cependant non significative, y compris en régression logistique selon Cox).

2. Discussion

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de notre étude. Tout d'abord, les résultats sus-décrits démontrent clairement que l'utilisation de l'irinotecan dans un schéma de traitement

combiné au 5-FU/Acide folinique, « annule » en quelque sorte l'impact péjoratif de certains génotypes liés au métabolisme du 5-FU, ce qui était notre hypothèse de départ. En résumé, il ne semble donc pas *a priori* utile de rechercher ces statuts en situation pré-thérapeutique en cas d'utilisation d'un protocole FOLFIRI. Cette recherche, encadrant les polymorphismes de la TYMS et de la MTHFR, pourrait garder néanmoins tout son intérêt dès lors que l'on cherche à prédire un éventuel impact sur la survie sans progression et donc sur la survie globale (puisque la survie sans progression est un marqueur de substitution de cette dernière dans le cancer colortectal métastatique [30-31]) d'un schéma simplifié de type LV5FU2, dont il apparaît clair que certains patients sélectionnés peuvent tirer un réel bénéfice au prix d'une bien moindre toxicité. Par ailleurs, et dans le cadre plus général d'une lecture critique de la littérature en recherche translationnelle, ces résultats comparés sur deux cohortes de patients homogènes et bénéficiant de traitements standardisés (LV5FU2 versus FOLFIRI) avec des schémas pharmacocinétiques au plus près du métabolisme des patients, tendent à démontrer que des conclusions de corrélations entre survies, toxicités et génotypes devraient être considérés avec précaution dès lors que des associations génotypiques de la TYMS ou de la MTHFR sont rapportés à des schémas combinés, au moins pour l'irinotecan. Ainsi quelles conclusions tirées d'études rétrospectives décrivant des analyses de ce type, mais associées à des schémas variés de traitements, combinant 5-FU modulé seul, FOLFIRI et/ou FOLFOX, *a fortiori* concernant plusieurs lignes de traitements, surajoutant ainsi aux interactions génotypiques et médicamenteuses probables que révèlent nos résultats, l'adaptation du métabolisme clonal à l'exposition des différents xénobiotiques ?

En second lieu, le suivi pharmacocinétique de doses pour le 5-FU couplé à la recherche systématique des quatre mutations les plus fréquentes de la DPYD associée au calcul préthérapeutique du rapport UH₂/U, permet notablement de diminuer les taux de toxicités sans perte de chance pour le malade, les taux de réponses et la survie sans progression avec le schéma FOLFIRI tel qu'il a été réalisé dans notre étude étant ceux habituellement rapportés dans la littérature. Dans ce cas précis, l'adaptation des doses a ainsi permis une bien meilleure tolérance sans perte de chance pour le malade, objectif prioritaire de la pharmacogénétique.

Enfin et concernant spécifiquement le statut UGT 1A1, nous avons fait l'hypothèse au vu de nos résultats, que le statut UGT 1A1 *28 homozygote (7/7, ou syndrome de Gilbert) était probablement lié à un taux de réponse médiocre (environ deux fois moins que pour les autres génotypes) et à des survies sans progression et globale plus courtes, du fait d'un taux de

toxicités plus élevées. Ce taux de toxicité augmenté pourrait en effet entraîner des diminutions posologiques combinées de 5-FU/irinotecan, des report de cures, et enfin des altérations du performance status, autant d'éléments d'impact négatif sur le pronostic global. Contrairement à cette population probablement « sur-dosée », correspondant à ce que nous avons défini dans le **chapitre II.2** comme « Métaboliseurs Lents », il apparaît au regard des courbes de survie globale, que la population de patients 6/7 tire au contraire le plus grand bénéfice d'une posologie standardisée à 180 mg/m² pour l'irinotecan (dose standard du FOLFIRI réalisé tous les 15 jours) réalisée en première ligne métastatique, alors même que la population 6/6 est, elle, probablement « sous-dosée » (« Métaboliseurs Rapides voire Ultrarapides »). Finalement le schéma posologique à 180 mg/m² du FOLFIRI retenu au cours du développement de l'irinotecan, et au vu de sa toxicité, correspond aux résultats attendus au sein d'une population hétérozygote du point de vue d'un métabolisme considérant l'UGT 1A1. La conclusion radicale qui peut en être tirée, et en prenant compte des fréquences génotypiques (environ 41% et 13% pour les statuts 6/6 et 7/7 respectivement) observées dans notre étude, est que plus d'un patient sur 2 (!) traité de façon standardisée par un tel schéma de traitement ne bénéficie pas d'une dose adaptée à son métabolisme basal. Dans ce cas il existe une perte de chance sur l'efficacité du traitement : soit par sous-dosage (les patients 6/6), soit par augmentation des toxicités aboutissant à une perte de la dose intensité (report de cures,...) (les patients 7/7).

Partant de cette simple observation, le rationnel pharmacogénétique d'une adaptation posologique prenant en compte le statut UGT 1A1 trouvait là sa justification. Ainsi a été conçue dans un second temps, une étude multicentrique visant faire la démonstration et en prospectif de cette hypothèse : l'essai « *FOLFIRI intensifié-Cetuximab* » proposé aux patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et en première ou deuxième ligne de traitement. Les résultats préliminaires de cet essai clinique de phase II, désormais fermé et réalisé entre décembre 2004 et février 2008, ont été présentés au dernier congrès américain d'Oncologie digestive (ASCO GI 2010). L'abstract accepté est présenté ci-après (**Abstract N°3**).

Dans cette étude, le schéma de traitement (tous les quinze jours pour le FOLFIRI) était le suivant :

- *Concernant le 5-FU*, dépistage individuel par phénotypage HPLC du rapport UH2/U et génotypage de la DPYD. Les posologies initiales de 5-FU étaient

abaissée de 50% puis adaptées si rapport UH2/U bas (<7) et/ou mutation connue de la DPYD mise en évidence.

Dans les autres cas, posologies initiales de 2400 mg/m² sur 48h après 5-FU Bolus de 400 mg/m² et acide folinique à 200 mg/m² (LV5FU2 adapté). Les cures suivantes étaient adaptées à la pharmacocinétique après recueil d'un échantillon sanguin 2h avant le retrait de la pompe de 5-FU (à l'état d'équilibre).

- *Concernant le cetuximab* : 400 mg/m² dose de charge lors de la première injection, puis 250 mg/m² chaque semaine. A noter que l'impact prédictif du statut KRas n'était pas connu au moment de la conception de l'essai: les données d'inefficacité de ce type de traitement ciblé en cas de mutation KRas ne furent communiqués et publiés qu'après la fin de l'essai. Ainsi tous les patients ont bénéficié du cetuximab dans le cadre de notre étude.
- *Concernant l'irinotecan*, en cas de génotype 6/6 : 216 mg/m² en dose initiale puis augmentée à chaque cycle de 20% si bonne tolérance clinique et hématologique jusqu'à 300 mg/m²; pour le génotype 6/7 180 mg/m² puis augmentés ; pour le génotype 7/7 (syndrome de Gilbert) : 125 mg/m² puis augmenté de 10% à chaque cycle si bonne tolérance clinique et hématologique jusqu'à 180 mg/m² au maximum.

104 patients ont été inclus. L'âge médian était de 63 ans. 85 patients étaient en deuxième ligne, 19 en première. 6 patients ont eu une diminution initiale de 5-FU (5 pour un déficit partiel en DPYD, 1 compte-tenu de l'âge). Le 5-FU a pu être augmenté progressivement jusqu'à une dose de 7000 mg/m² au 12e cycle chez un patient, soit près de trois fois la posologie initiale, démontrant bien l'intérêt d'être au plus près du métabolisme du sujet comme de la tumeur. 8 patients étaient homozygotes UGT 1A1 *28. 79% ont reçu au moins 6 cycles de traitement, 38% au moins 12. 84 évènements indésirables ont été rapportés et le traitement a été excellentement toléré : 13% de grade 3 et 1% de grade 4. Aucune différence significative n'a été notée avec le statut UGT 1A1 et, alors que tous les patients 7/7 ont eu au moins 6 cycles jusqu'à un maximum de dose de 153 mg/m², aucune toxicité de type diarrhée ou neutropénie de grade 4 n'a été relevée dans cette population. Enfin les taux de réponse (évalués sur 87 patients) étaient excellents : 71% de maladie contrôlée (Disease Control = DC) dont 32% de réponse objective (ORR, = Réponse complète + Réponse partielle) (**Voir Abstract N°3 et Figure 36**).

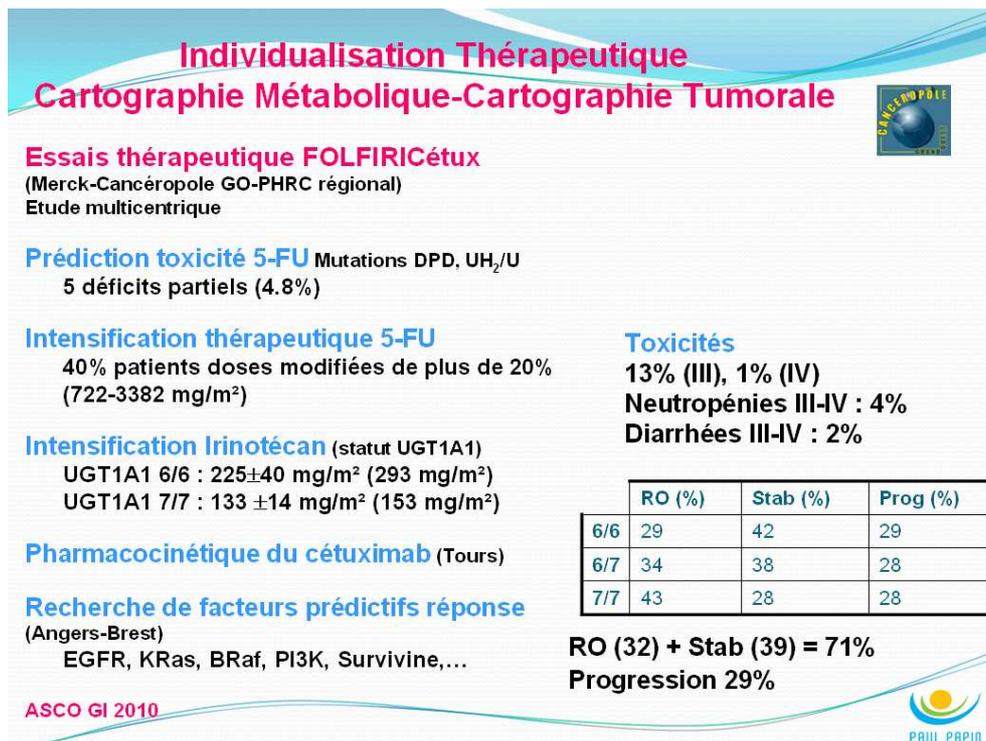


Figure 36. Avec l'aimable autorisation du Docteur Boisdrion-Celle M.

Les taux de Maladie Contrôlée (= Taux de Réponse Objective + Taux de Maladie Stable) sont remarquablement identiques pour chaque cohorte de patients et selon le génotype de l'UGT 1A1 : 71 ou 72%, ce qui traduit l'absence de perte de chance pour les malades, qui pourrait être liée à l'adaptation individuelle de doses d'irinotecan (critique principale relevée dans les symposiums et congrès lorsqu'est évoquée la pharmacogénétique).

Ces taux de réponses sont par ailleurs tout à fait majeurs (32% de réponse objective) si l'on considère qu'environ 82% des patients étaient traitées en deuxième ligne de traitement et qu'environ 40% d'entre eux ne tiraient *a priori* pas bénéfice de l'adjonction du cetuximab (fréquence habituellement rapportée de la mutation de la protéine de transduction Kras). A titre d'exemple, l'étude BOND évaluant l'efficacité du cetuximab en deuxième ligne métastatique ne rapporte, certes après progression sous première ligne par irinotecan, « qu'un » taux de réponse objective de 22,9% avec l'association cetuximab + irinotecan [26]. Beaucoup plus récemment, **Peeters M et al.** a rapporté au dernier ESMO 2009 (Abstract 14LBA), les résultats de la première étude de phase III évaluant l'intérêt d'associer le panitumumab à une chimiothérapie de type FOLFIRI en traitement également de deuxième ligne dans le cancer colorectal métastatique. Après amendement, l'étude a analysé spécifiquement l'efficacité des traitements chez les patients Kras sauvage ; ceux-ci n'avaient pas reçu en première ligne de traitement par irinotecan ni cetuximab. Les taux de réponse

objective étaient de 35% pour l'association contre 10% pour le FOLFIRI ($p < 0,001$), taux il est vrai incroyablement bas pour ce type de protocole en deuxième ligne de traitement (habituellement autour de 20-25%, **voir page 33**). Il n'en demeure pas moins que les taux de réponse dans cette population ciblée de patients (Kras sauvage) ne sont pas supérieurs à ceux observés dans notre étude « patients Kras tout venant », ce qui traduit bien l'impact de l'adaptation à la fois pharmacologique pour le 5-FU, et génotypique pour l'irinotecan, sur les résultats, ceci en l'absence de toxicités sévères : *les deux objectifs (moindre toxicité et meilleure efficacité) de la pharmacocinétique sont ici aussi atteints.*

La survie globale de l'étude « FOLFIRI + Cetuximab » ne sera pas connue avant plusieurs années et devra être analysée alors en prenant en compte les différents séquentiels de traitements réalisés *avant et après* ce schéma de chimiothérapie. Le recul est cependant désormais suffisant pour l'analyse de la survie sans progression (SSP), marqueur de substitution de la survie globale. Les résultats sont excellents : 189 jours soit un peu plus de 6 mois (**Figure 37**), pour une étude dont, on le rappelle, 82% des patients étaient traités en situation de deuxième ligne métastatique.

Plus intéressant encore, et corrélé avec les observations faites plus haut sur les taux de Maladie Contrôlée, l'adaptation des posologies de l'irinotecan au statut UGT 1A1, et en association au cetuximab, a permis :

- ✓ Non seulement, d'augmenter les taux de survie sans progression pour la population globale (6 mois *versus* 4 en moyenne pour les autres schémas de traitements (**voir Tableau II page 32**), soit un gain absolu d'environ 50%, et ce alors même qu'une part non négligeable de la population étudiée présente une néoplasie constitutionnellement résistante à la biothérapie par anti-EGFR
- ✓ Mais surtout d'offrir à chaque sous-population de patients (fonction du génotype), un traitement manifestement adapté et optimal puisque les courbes de SSP selon le statut UGT, sont parfaitement superposables (**Figure 38.2**), confortant les remarques énoncées **page 138** concernant l'aspect des courbes de survie globale de la **publication N°2 (Figure 38.1)**. Ainsi la prise en compte du génotype de l'UGT a, en quelque sorte, « lissé » les disparités interindividuelles, preuve s'il en est de l'intérêt du concept de pharmacogénétique.

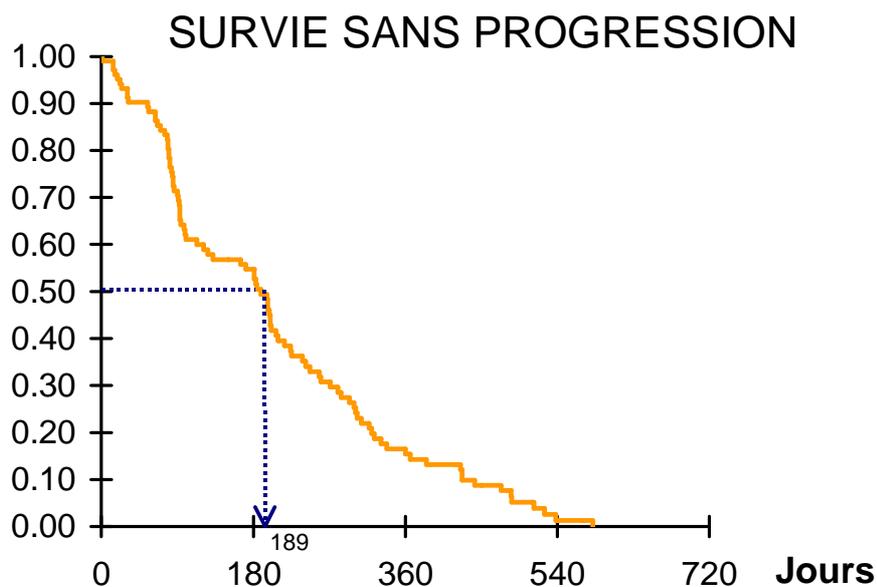


Figure 37. *Survie sans progression de l'étude « FOLFIRI+Cetuximab ».*

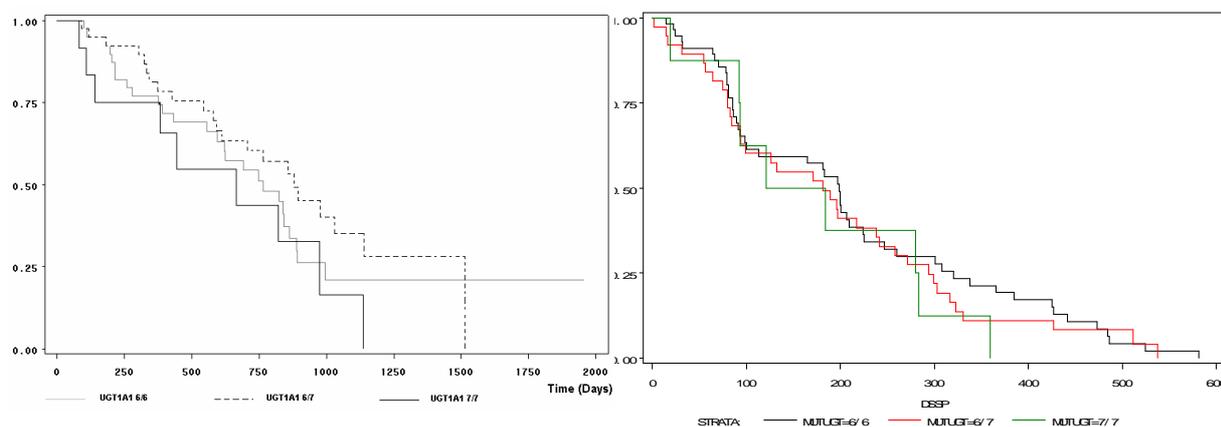


Figure 38. *Comparaison de l'aspect des courbes de Survies selon le statut UGT.*
 1. *A gauche sans adaptation (Survie globale); Publication N°2*
 2. *A droite avec adaptation des posologies de l'irinotecan (SSP)*
Etude « FOLFIRI + Cetuximab »

D'autres données de recherche translationnelle réalisées parallèlement à cet essai clinique sont en cours d'exploration et pour certaines, feront également l'objet de présentations en poster à l'ASCO GI 2010 : influence du statut mutationnel des récepteurs EGFR et influence des mutations des gènes Kras, Braf et PI3KCA. Concernant ces dernières, l'analyse rétrospective (**Abstract N°4**, Linot B. *et al*) réalisée au sein de notre laboratoire sur 54 des 104 patients retrouvent très clairement les données connues concernant l'impact négatif des mutations Kras sur l'efficacité du cetuximab, mais ce même impact négatif est retrouvé concernant les mutations de Braf (Kras + Braf = Voie des MAP Kinases) et plus étonnant de PI3K (**Tableau XI et Figures 39 et 40**).

Tableau XI. Maladie Contrôlée à 3 et 6 mois selon le génotype.

	Nbre Patients (%)	à 3 mois	à 6 mois
Population globale	54 (100%)	61,1%	46,3%
Aucune mutation	19 (35,2%)	84,2%	73,7%
Voie MAP Kinase mutée	23 (42,6%)	52,2%	17,4%
PI3 Kinase mutée	21 (38,9%)	47,6%	28,6%
MAP WT et PI3KCA mutée	13 (24%)	41,7%	73,7%
Au moins 1 mutation	35 (64,8%)	48,6%	31,4%

Les résultats rapportés lors des derniers congrès ASCO 2009 et ESMO 2009, ont en effet confirmé, en les réactualisant (Etudes CRYSTAL et OPUS [25, 28]), les données déjà disponibles sur les mécanismes de résistance aux anticorps anti-EGFR.

Il en ressort que parmi les nombreux biomarqueurs à l'étude :

- la présence de mutations au niveau des gènes Kras et Braf est un puissant facteur prédictif de non-réponse au traitement par anti-EGFR dans le cancer colorectal, ce que nous retrouvons dans notre étude.
- Les mutations Kras et Braf sont mutuellement exclusives
- Des mutations PI3KCA peuvent coexister avec celles des gènes Kras ou Braf (16,7% de patients dans notre population de 54 patients présentent une mutation conjointe des deux voies de transduction)
- Les mutations PI3KCA ne sont pas retenues comme facteur prédictif de non-réponse au traitement par anti-EGFR, mais elles peuvent renforcer la diminution de la réponse au traitement lorsqu'elles s'associent aux tumeurs de type Kras muté.

Cette dernière observation est issue de l'étude du Consortium Européen présentée par **Tejpar S et al. (Abstract 6005, ESMO 2009)** : Cette série rétrospective multicentrique portant sur 723 patients ayant un cancer colorectal métastatique chimiorésistant, traités par Cetuximab et irinotecan, a retrouvé (données de protéomiques) 39% de mutations Kras, 5% de mutations Braf, et enfin 3 et 14% respectivement de mutations Nras et PI3KCA. Les mutations de Kras, Nras et Braf étaient effectivement exclusives mais les mutations PI3KCA étaient associées respectivement dans 20% et 10% des cas de mutations Kras et Braf (16,7% dans notre étude). Les mutations de Kras étaient significativement associées à l'absence de réponse à l'association cetuximab + irinotecan (6% versus 36%, $p < 0,001$), de même que les mutations de Braf ($p < 0,001$) et Nras ($p = 0,014$) dans la population restreinte aux Kras sauvages. La différence en terme de réponse n'était pas significative en revanche concernant les mutations

PI3KCA (21% versus 38%, $p=0,075$) chez les patients Kras sauvages. La survie sans progression était également diminuée en présence d'une mutation Kras (12 vs 26 semaines, $p<0,001$), de Braf (7,5 vs 18 semaines, $p<0,001$) et de PI3KCA (12,5 vs 18 semaines, $p=0,007$). Cette dernière différence disparaissait dans le sous-groupe Kras sauvage où la présence d'une mutation PI3KCA n'influe pas sur la survie sans progression (18 versus 24 semaines, $p=0,176$). En conclusion et concernant les mutations PI3KCA, leur valeur prédictive n'apparaît pas assez bonne pour justifier de restreindre la prescription de cetuximab aux patients non mutés PI3KCA d'autant que le taux de réponse chez les patients mutés était encore de 21%.

Ainsi notre étude, certes ne portant que sur 54 patients, ne retrouve pas les mêmes conclusions :

- la fréquence des mutations de PI3KCA apparaît nettement plus importante ; ceci peut être lié aux types et nombres des mutations recherchées (exon 9 et 20), ainsi qu'à la technique (génétique dans notre cas, protéomique dans l'étude rapportée par Tejpar *S et al.*). 38,9% des patients sont retrouvés mutés contre 14% dans cette dernière, qui correspond au taux habituellement rapporté dans la littérature [171].
- Dans la population restreinte à Kras et Braf sauvage, les taux de réponse objective sont statistiquement différents à 3 mois selon le statut PI3KCA (57,9% pour les sauvages versus 33,3% chez les mutés, $p=XX$) mais non à 6 mois (21,1% versus 25%).
- Enfin, les mutations PI3KCA apparaissent délétères sur la survie sans progression (2,8 versus 9,8 mois, $p= 0,017$) dans notre étude, ce qui est en contradiction avec les résultats rapportés à l'ESMO 2009 (**Figure 39**). D'éventuels biais dans la sélection des patients, la différence de protocoles, l'intensification des doses de 5-FU et d'irinotecan et le contexte de deuxième ligne métastatique, pourraient expliquer en partie ces résultats contradictoires mais qui méritent réflexion sur l'intérêt futur à porter quant au positionnement de la recherche des mutations de PI3KCA dans le contexte des thérapies anti-EGFR.

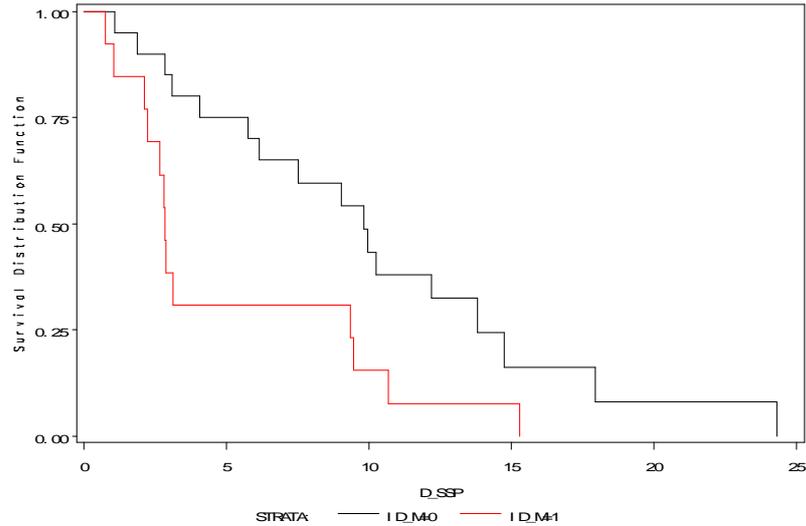


Figure 39. *Survies sans progression en fonction du statut des mutations de PI3KCA dans la population MapKinase sauvage.* La courbe rouge correspond à la population présentant au moins une mutation PI3KCA (5 patients ont 2 mutations simultanées sur l'exon 9 et 20).

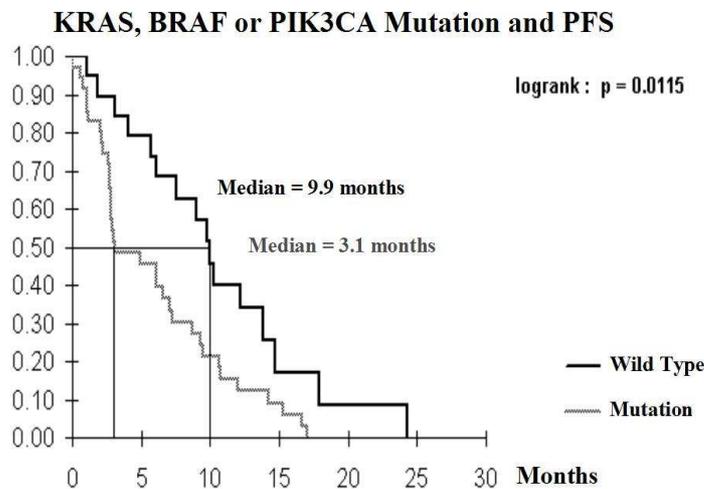
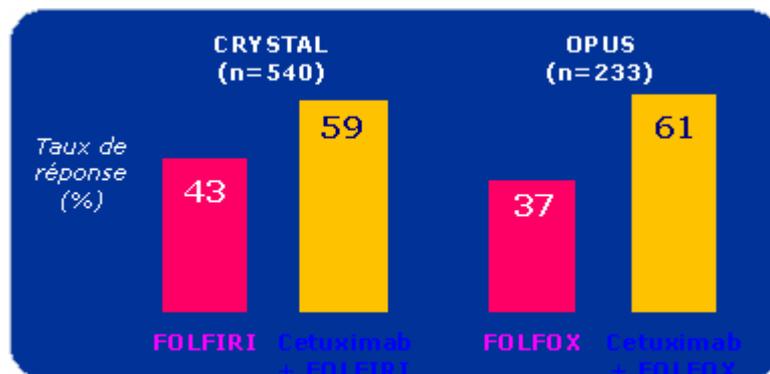


Figure 40. *Survies sans progression en fonction du statut des mutations de la voie des MAP Kinases et PI3 Kinase.*

La courbe grise correspond à la population présentant au moins une mutation au niveau de Kras, Braf ou PI3K.

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de la population de patients avec au moins une mutation au niveau de ces trois gènes d'intérêt, représente près de 64,8% de l'ensemble (!) avec une survie sans progression presque trois fois moindre que la population de patients « sauvages » (Figure 40).

A l'inverse, en cas d'absence de mutation pouvant interférer avec l'efficacité du cetuximab, les taux de réponses atteignent plus de 80 % pour le contrôle de la maladie à 6 cycles (3 mois), dont 58 % de réponse objective (contre 25% si une mutation au moins est présente). Ces taux de réponses, on le rappelle en deuxième ligne métastatique, sont comparables avec ceux observés en première ligne dans la population Kras sauvage de l'étude CRYSTAL (84 % de contrôle de la maladie et 59% de réponse objective) [25]. Des taux très proches sont également retrouvés avec un schéma FOLFOX + Cetuximab (Etude OPUS), mais toujours en première ligne [28].



Ceci dit, si les taux retrouvés correspondent à ceux décrits dans la littérature et dans une étude de grande ampleur (CRYSTAL), mais de première ligne de traitement, il n'en est pas de même concernant le niveau de toxicités. Ainsi dans CRYSTAL et sur une médiane de traitement de 6 mois, ont été rapportés :

- ✓ *Bras A (FOLFIRI + Cetuximab)* : 79% toxicité grade 3-4 dont 28% de neutropénies (3% fébrile), 16% de diarrhée, 20% de toxicité cutanée et 2.5% de réaction à l'injection grade 3-4 (0.8% décès toxique – 0% au cetuximab)
- ✓ *Bras B (FOLFIRI seul)*: 61% toxicité grade 3-4 dont 25% de neutropénies (2% fébrile), 10% de diarrhée, 0.2% de toxicité cutanée et 0% de réaction à l'injection grade 3-4 (1% de décès toxique)

On le rappelle dans l'étude concernant la publication N°2 (parallèle au bras B), seulement 8,7% de toxicités de grade 3-4 étaient notifiés et dans l'étude « FOLFIRI intensifié + cetuximab » (parallèle au bras A) 14%. En dehors des toxicités strictement cutanée liées à l'utilisation du cetuximab, l'adaptation pharmacogénétique (5-FU et irinotecan) et pharmacocinétique (5-FU) apportent ainsi un gain évident en terme de qualité de vie pour le patient (sans même considérer le gain économique des complications liés au traitement) avec une efficacité parfaitement maintenue, voire très améliorée.

3. Publication N° 2

The influence of pharmacogenetic polymorphisms on 5-fluorouracil and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer.

Capitain, Olivier (MD)^{1,2}, Asevoaia, Andrea¹, Boisdron-Celle, Michèle¹ (PharmD-PhD), Poirier Anne.Lise.³, Guerin-Meyer, Véronique² (MD), Morel, Alain¹ (PhD), Gamelin, Erick^{1,2}(MD-PhD).

¹Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U892, Université d'Angers

²Department of Medical Oncology,

³Department of Statistics and Data Management

**Centre Paul Papin, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer
49933 Angers Cedex, France.**

Running Title: Fluorouracil and Irinotecan Efficacy and Toxicity

Corresponding author: Boisdron-Celle Michèle

Address: Centre Paul Papin

Dept. Oncopharmacology – Pharmacogenetics

INSERM U892

49033 Angers Cedex

France

Telephone: +33 241 352700

Fax: +33 241 352722

E-mail: m.boisdron@unimedia.fr

Text: 15 pages

Tables: 7

Figure: 1

References: 36

Appendices: 1

Abstract: 204 words

Abbreviations: fluorouracil, (FU); irinotecan, (CPT11); thymidylate synthase, (TYMS); dehydropyrimidine dehydrogenase, (DPYD); methylene tetrahydrofolate reductase, (MTHFR); single-nucleotide polymorphism, (SNP).

KEYWORDS

Pharmacogenetic, Polymorphisms, 5-fluorouracil, Irinotecan, Efficacy, Colorectal Cancer.

ABSTRACT

Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD), Thymidylate Synthase (TYMS) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) polymorphisms are predictive of safety and efficacy in 5-FU based chemotherapy. Uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 (UGT 1A1) is involved in irinotecan detoxification pathway. In this current study, we evaluated the potential correlation between 9 germinal polymorphisms of these enzymes, and clinical outcome and safety parameters in ninety patients with metastatic colorectal cancer treated by pharmacokinetically monitored 5-FU/Leucovorin plus irinotecan (FOLFIRI regimen). In case of DPYD relevant SNPs, initial 5-FU dose was reduced. Overall response rate was 42.3%, and median overall and progression-free survivals were 27.4 and 7 months respectively. 5-FU related severe toxic side-effects were rare (8.7%). UGT1A1*28 7/7 genotype was statistically correlated with a higher risk of grade 3-4 toxicity ($p=0.047$), especially neutropenia and diarrhea, with a lower response rate (16.7%).

In conclusion, after pre-therapeutic DPYD genotyping followed by 5-FU monitoring, specific 5-FU toxic side-effects incidence was low and efficacy of tailored FOLFIRI high. Irinotecan addition cancelled out TYMS 3R/3R and MTHFR C/C for 677C>T or A/A 1298A>C as 5-FU predictive factors of resistance previously described with LV5FU2 regimen. UGT1A1*28 7/7 genotype was associated with a higher risk of toxicity. 5-FU pharmacokinetic monitoring, DPYD and UGT1A1*28 genotyping should be considered for optimizing FOLFIRI regimen.

INTRODUCTION

Pharmacogenetics has become increasingly important in the management of cancer treatment by identifying biomarkers that can screen patients with increased risk of adverse side-effects or with a decreased likelihood of tumor response, and help to target patients for therapy. For example, since the fifties, 5-FU is the most commonly administered chemotherapy agent for the treatment of colorectal cancer in both advanced or adjuvant situations. Unfortunately, its optimal use remains unclear because of a complex metabolism pathway and a high level of inter-individual variability. The majority of tumours do not respond to the single treatment (lower than 10% of response rate with monotherapy and about 20% by adding leucovorin (5-formyltetrahydrofolate), an addition that has remained the standard therapy for many years) whereas the majority of patients suffer from drug-related toxicity **(1-3)**.

In previous studies we and others identified biomolecular determinants for 5-FU response and toxicity prior to treatment for advanced colorectal cancer, and particularly three enzymes involved in the fluorouracil activity and metabolism: *Thymidylate synthetase (TYMS)*, the primary target of 5-FU, that presents a double polymorphism in its enhancer region: a 28-base pair (bp) tandem repeat sequence called 'R' within the 5'-untranslated region, with an increasing number of repeat sequences **(4-5)** and a common variant recently identified at the 12th nucleotide of the second repeat in the 3R allele that can stop USF-1 binding and decrease transcriptional activity **(6-8)**; *Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)*, that accounts for 80% of drug clearance, is submitted to genetic polymorphism associated with a low activity level and potential severe adverse side effects to 5-FU **(9-10)**; and *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, that is also subject to a common polymorphism leading to variable activity; the most common two in Caucasians being MTHFR 677 C>T and MTHFR 1298 A>C **(11)**.

We have previously shown in patients treated with 5-FU and leucovorin-based regimen that we can easily discriminate patients with a high risk of life-threatening toxicity (DPYD's Single Nucleotide Polymorphisms and C/C for MTHFR 1298 A>C), and with a predicted shorter survival time (3R/3R TYMS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C) concerning only **(12)**.

Therapeutic options have been dramatically improved with cytotoxic agents such as irinotecan and oxaliplatin (13-15), and more recently targeted therapies such as bevacizumab or cetuximab, but at least 2 problems remain for targeting therapy to individual patients: firstly the current relevance of the 5-FU-specific predictive factors of efficacy, and secondly, the determination of predictive factors of combination therapies.

Concerning irinotecan, uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) detoxifies SN38, its active and toxic metabolite, *via* glucuronidation into the inactive SN-38 glucuronide (SN-38G). A common polymorphism in the Caucasian population consists of a TA insertion in the TATAA element of the 5'promoter region of UGT1A1*28 (16-17). Genotypes are described as 6/6, 6/7 and 7/7, indicating the number of TA repeats in the two alleles. The mutant homozygote UGT1A1*28 7/7 (i.e. A(TA)7TAA for the promoter genotype), so-called Gilbert's syndrome, is related to a decreased activity level of this enzyme, increased levels of SN-38, and higher risk of severe irinotecan-induced neutropenia toxicity (18-21). UGT1A1*28 genotype is considered as predictive of toxicity in cancer patients receiving irinotecan but is not detected in practice.

The purpose of this present study was to determine predictive factors of tumor response, tolerance and survival times, to FOLFIRI regimen with 5-FU pharmacokinetically guided administration, with the question of whether or not the addition of irinotecan reduced or even abolished the impact of specific 5-FU predictive factors on efficacy and explained certain contradictory results (22). Thus, we investigated TYMS, DPYD, MTHFR and UGT1A1*28 genotypes as predictive factors of treatment outcome.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This study included 90 patients treated for advanced colorectal cancer according to the so-called FOLFIRI regimen, including 5-fluorouracil, leucovorin and irinotecan. To be eligible for inclusion in the study, the patient had to be at least 18 years old, present measurable metastatic lesions, and have an estimated life-expectancy of at least 3 months. All patients were required to have normal bone marrow and organ function (particularly the hepatic function with a normal bilirubin rate) before the administration of drugs. The performance status was evaluated as defined by the World Health Organization (WHO). Written informed consent was obtained from all patients before peripheral blood samples were taken for biomolecular analysis. A computed tomography scan was performed prior to treatment and then every 3 months until progression, and metastatic lesions were measured according to RECIST criteria.

Chemotherapy regimen description

Irinotecan was administered biweekly, before 5-FU treatment, for 2 hours. The initial dose was 180mg/m², regardless of the UGT1A1*28 genotype, i.e. with no reduction for UGT1A1*28 7/7 patients. 5-FU was administered for 46 hours after treatment with 200mg/m² of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m² of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m² and then tailored according to our institute's practice, using pharmacokinetic monitoring as previously described according to fluorouracil plasma concentrations after 43 hours (steady-state concentration) and dose-adjustment charts (23). In cases of DPYD relevant SNPs, i.e. 2846A>T, IVS14+1G>A, 1590T>C, 464 T>A, the initial dose was decreased by 50% (12). Treatment was continued until progression was documented, severe toxicity took place, or according to the patient's or physician's decision.

Follow-Up

Every fortnight, each patient was physically examined and any adverse toxic events were evaluated and graded. Treatment efficacy was evaluated by comparing pretherapeutic metastatic lesion measurements to those remaining after 3 months of treatment, and then every 3 months. Data were collected until the death of the patient or until the termination date of the study (01/04/2006) and any treatment administered after progression under the FOLFIRI regimen was recorded.

Response assessment

The response was assessed according to the 'Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group Criteria' and by reviewing computed tomography scans. The overall survival time (OS) was defined by the period between the date of the start of treatment and the date of death, regardless of the cause. Progression-free survival (PFS) was defined by the time between the start of treatment and the date of progression (clinical or radiological progression) or death.

Tolerance assessment

All adverse events, especially gastrointestinal events, mucositis, hand-foot syndrome, conjunctival irritation, and leucopaenia, were recorded and graded for severity according to NCI-CTC scales. Haemogrammes were performed every 2 weeks; electrolyte tests and tests on urea, creatinine and liver enzymes were carried out every month. In the event of significant grade 2 toxicity - and without pharmacokinetic recommendations for a decrease of 5-FU -, the dose was reduced by 10%. In cases of grade 3 toxicity, the treatment was interrupted until toxic manifestations were resolved and treatment was then restarted with a decrease of 25% of 5-FU or irinotecan according to the type of toxicity. Treatment was stopped in cases of grade 4 toxicity.

Genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the blood DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each sample was controlled with respect to DNA isolation by UV transillumination of ethidium bromide-stained gels from subsequent electrophoretic separation in 2% agarose. DNA was isolated from 90 subjects and was used to identify TYMS, DPYD, MTHFR and UGT1A1*28 polymorphisms. For each batch, appropriate positive and negative controls of established genotypes were assayed.

The determination of TYMS polymorphisms and G>C single nucleotide polymorphism.

The determination of the double polymorphism of TYMS has been described in a previous study (12). Briefly, a fragment of TYMS Enhancer Region (TSER) containing the repeats was amplified using the following forward and reverse primers: -CGCGGAAGGGGTCCTGC- and -TCCGAGCCGGCCACAGGCAT- respectively. The expected fragment sizes were 108bp for 2R and 136pb for 3R. After running on HYBAID with 35 amplification cycles

(denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 62°C for 60 seconds, and extension at 72°C for 1 minute), the amplification products were electrophoresed in 1X TBE on agarose gel at 2% with ethidium bromide 1X (0.5µg/µL) for screening. Finally, the G>C single nucleotide polymorphism (SNP) within the second repeat in the 3R allele was determined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis after purification with the QIAquickTM system kit (Qiagen®) and digestion with the *Hae III* (Sigma®) restriction enzyme (GGCC restriction site). The digested PCR products were loaded and electrophoresed into adjacent lanes on a 3% agarose gel containing ethidium bromide 1X.

The determination of DPYD and MTHFR polymorphisms.

As previously described (12), the analysis of DPYD and MTHFR polymorphisms was based on pyrosequencing technology (bioluminometric real-time sequence determination). For DPYD polymorphisms, four SNPs, associated with severe DPYD deficiency, and hence with potentially life-threatening toxicity under the 5-FU regimen, were systematically analyzed: IVS 14+1G>A within intron 14, 2846 A>T within exon 22, 1679 T>G within exon 13 and 464 T>A within exon 5 (24 and Appendices). For MTHFR polymorphisms, the two commonest SNPs in the Caucasian population were analyzed: 677 C>T and 1298 A>C. For each polymorphism, the specific primers for prior biotinylated PCR are detailed in the Appendices.

The determination of UGT1A1*28 genotypes.

To sequence the mutations of the UGT1A1*28 gene, we used the technique previously set up in our laboratory (25). PCRs were performed with an initial denaturation for 5 min. at 95°C, followed by 50 cycles of denaturation for 30 seconds at 95°C, primer annealing for 30 seconds at 60°C, and extension for 1 minute at 72°C, followed by a final extension for 5 minutes at 72°C. All amplification reactions were performed in a DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, Boston, MA) with 1 unit of Taq Polymerase (Euroblue Taq; Eurobio, France). The different sets of primers used to amplify the sequences of interest, including the polymorphisms in the UGT1A1*28 gene have previously been described (25). For the determination of the TATAA box genotypes, two PCR fragments were designed to analyse the sequence both in forward and reverse sense to increase the reliability of the analysis. Templates for the pyrosequencing analysis were prepared as recommended by the manufacturer, and the reaction was performed at 28°C on an automated PSQ 96 instrument

(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). The optimal time interval between the addition of two nucleotides to obtain the most accurate pyrogrammes was 120 seconds.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SPSS© software (Chicago, USA). The χ^2 test and Fisher's exact Test were used for the comparison of different frequencies. The α error risk was classically chosen at 5%. Kaplan-Meier plots and Log-rank Test were employed in univariate analysis of overall survival (OS) and progression free survival (PFS), Cox regression was employed for univariate and multivariate survival analysis. The logistic regression method was performed to evaluate toxicity risk in univariate and multivariate analysis. The same method was used to analyze response to tailored FOLFIRI treatment. Finally χ^2 test was used to compare the allele frequency of each variant with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium.

RESULTS

Clinical data and genotype frequencies.

Ninety patients who fulfilled the inclusion criteria were studied between October 1999 and August 2005. The median follow-up was 1,140 days (3.1 years) with 8.0 to 74.1 months (6.1 years) as a range. Clinical characteristics of the patients are given in **Table I** and are in agreement with epidemiological data on advanced colorectal cancer. The median age was 64.5 with 23 and 82 years old as a range. 95.5% of patients had good performance status lower than 2. The sex ratio was 2.2. The metastasis site was unique in 80% of cases with 2/3 of cases in the liver. 93.3 % of patients were treated in first-line therapy, except 6 treated after a combination of 5-FU/leucovorin and oxaliplatin chemotherapy (FOLFOX regimen). After tailored FOLFIRI regimen, 81.2%, 38.3% and finally 14% of patients could receive second, third and fourth line respectively. FOLFIRI has been reused in third or fourth line in 8% of patients. 75% of the population received FOLFOX regimen- mainly in second line-, 32% 5-FU monochemotherapy -either by intra-venous way, or per os-, and finally 11.2% received one or several targeted therapies (especially cetuximab and/or bevacizumab).

Table II lists the distribution of TYMS, DPYD, MTHFR and UGT1A1 gene polymorphisms. This distribution was similar with data previously described in the Caucasian population (**11, 21, 26-28**): 24.4% for 2R/2R (TYMS genotype frequencies were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium), 8.9% for MTHFR 1298 C/C, 11.1% for MTHFR 677 T/T, 3.3% for DPYD polymorphism heterozygotes (two for IVS 14 + 1G>A and one for 2846 A>T) and 13.4% for UGT1A1*28 7/7 (Gilbert's syndrome). Comparisons on age (≤ 75 or > 75 years old), gender, performance status, number of metastatic sites according to studied polymorphisms showed a difference on performance status for UGT1A1*28 ($p=0.045$) and on age for TYMS polymorphisms ($p=0.003$). These results were considered for the next statistical analysis.

The correlation between polymorphism and toxicity.

289 adverse events (91.3% grade 1-2 side-effects) were reported, especially diarrhea (14.2%) with five grade 3 events and no grade 4 events, and asthenia (25.6%) with a majority of grade 1 or 2 events (90.5%); 8.7% grade 3-4 toxic side-effects (but no toxic death) were observed; 11.7% of patients suffered from grade 1-2 nausea, under setron-based antiemetic drugs.

The incidence of severe hematological grade 3-4 events was 2.8%, especially neutropenia. One grade 3 case of cardiac toxicity was noticed but with no resultant myocardial infarction. Three patients had the relevant DPYD gene SNP. After an initial dose reduction of 50% followed by pharmacokinetic dose adjustment, we observed one grade 4 neutropenia, one grade 2 and one grade 1 diarrhea, two grade 1 nausea events, and finally two grade 2 asthenia. No difference of toxicity grade or type was found in correlation with TYMS polymorphism, TYMS expression, or MTHFR SNPs, including C/C homozygous for MTHFR 1298A>C A1298C as previously described (**12**) (**Table III**).

In the UGT1A1*28 7/7 population, twelve patients -13.4% of the whole population-, without associated DPYD SNP, had a significantly higher incidence of severe grade 3-4 side-effects, 26.2%, with two grade 3 diarrhea events in spite of symptomatic treatment, and especially three grade 4 neutropenia compared to the 6/7 group (p=0.036). The principal other adverse side-effects were nausea (14.3%) and asthenia (26.2%) but with the same frequencies than in the global population. Neutropenia, diarrhea and nausea graded 3-4 were significantly linked to UGT1A1*28 in univariate analysis: UGT1A1*28 7/7 patients had a higher risk of toxicity than UGT1A1*28 6/6 ones (p=0.058, OR 3.4; 95%CI, 0.74 to 15.6). There was no significant difference between 6/6 and 6/7 genotypes (**Tables IVa and IVb**).

The correlation between polymorphism and response.

The overall response rate [ORR] (complete response [CR] plus partial response [PR]) rate) was 42.3% (n=38) with 7.8% (n=7) of complete response, stable disease [SD] was 11.1% (n=10) and progressive disease [PD] was 46.6% (n=42) in agreement with known data with FOLFIRI regimen in advanced colorectal cancer (**13-14**). We observed for UGT 1A1*28 7/7 cohorts the ORR decreased to 16.7% compared to about 40 to 50% for other UGT 1A1 genotypes - or TSER polymorphisms and TS expression -, with a p-value very near to 0.05 (0.054 with the Pearson Test). The ORR seemed improved in T/T for MTHFR 677 C>T and C/C for MTHFR 1298 A>C populations with 50% and 62.5% respectively (no significant p-value was found). Results of logistic regression analysis were shown in **Table IVa**: no variable was significant in uni- or multivariate analysis of biological parameters for predicting response to treatment, but, for UGT1A1*28 7/7 cohort, a trend as predictive factor of worse response (p=0.1302; OR 0.357; 95%CI, 0.06 to 1.99) was noted.

The correlation between polymorphism and survival.

The overall survival rate was 10% after 5 years. The median overall survival time was 27.4 months. Median progression-free survival time was 7 months. Univariate Cox analysis according to clinical characteristics was statistically significant with longer survival time for performance status < 2 (p=0.001, OR 5.78; 95%CI, 2.03 to 16.51) and an age younger than 75 years old (p=0.031, OR 2.29; 95%CI, 1.08 to 4.85)

Heterozygotes A/C for MTHFR A1298C had a shorter survival (p=0.042; OR 1.97; 95%CI, 1.13 to 3.42). There was no difference between overall or progression-free survival and MTHFR genotypes 677 C>T.

Univariate analysis for overall survival according to TYMS genotypes was not significant (p=0.74 with respectively OR 1.28; 95%CI, 0.67 to 2.46 and OR 1.11; 95%CI, 0.51 to 2.41), in contradiction with previous observations with 5-FU monotherapy (**12**); no difference was found between overall survival time and 'High' or 'Low' TYMS expression. (**Table IV and V**).

Finally, we found no significant difference between the overall survival time of the patients with a 3R/3R TYMS genotype associated with C/C for MTHFR 677 A>C or A/A for MTHFR 1298 A>C, and that of the patients with another genotype, contrary to previous data (**12**).

Concerning UGT1A1*28 status, we found a trend to a longer overall survival time for the 6/7 group (**Figure 1**) but it was not statistically significant and not confirmed by Cox regression method.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the respective impacts of gene polymorphisms metabolism enzymes in terms of tolerance and efficacy of FOLFIRI regimen considered as a reference combination for advanced colon cancer (13-15).

Actually, despite some progress in the management of advanced colorectal cancer, many questions remain unresolved:

- What kind of chemotherapy should we choose and at what level of intensity?
- Can we still use 5-FU alone, as suggested by 2 randomised studies that recently compared first-line 5-FU plus folinic acid therapy to the same drugs plus irinotecan, and found no difference in terms of progression-free survival after the second line and overall survival? (29-30); or, do we have to intensify every treatment by combining targeted therapy to cytotoxic bitherapy or even systematically use a combination of drugs?
- In that case, how much the drug added to 5-FU impact the relevance of specific 5-FU predictive factors of efficacy/toxicity?
- Is there a high risk of severe toxicity with chemotherapy? Does the patient have a metabolic deficiency? How can we manage it?

Retrospective and prospective studies have been carried out, looking for correlations between tumor molecular characteristics or constitutional factors and clinical outcome in the aim to determine biomarkers which would help clinicians to choose the appropriate combination and to determine the optimal drug dosage (31-33).

Since 5-FU is the cornerstone for the treatment of colorectal cancer, different teams have focused on its metabolism and resistance factors, such as TYMS, MTHFR, DPYD (31-35). We have shown in a large, prospective multicentric phase II study, that pharmacokinetic tailoring for 5-FU administration, and the systematic detection of DPYD deficiency by genotyping, allowed us to both reduce severe adverse effects and to provide high survival rates and response percentages (23-24). We and others have shown that C/C patient groups for MTHFR 1298 A>C or heterozygous groups for DPYD were at a higher risk of toxicity. Two populations could as well be individualized for a significantly shorter survival time: 3R/3R TYMS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C (12).

In the present study, our question was: does an additional drug, presently irinotecan, with both different metabolic pathway and mechanism of action, modify the relevance of specific 5-FU biomarkers on tolerance and efficacy? To try to answer this question, we studied a population of patients treated with a FOLFIRI regimen, with 5-FU dose individually adjusted based on pharmacokinetic follow-up (23-24).

We investigated TYMS, MTHFR, and DPYD using a fast, reliable method described in a previous article (12). Since we previously reported that the UGT1A1*28 TATAA box 7/7 genotype was linked to an increase of severe toxic side effects, potentially interfering with treatment efficacy, we also investigated UGT1A1*28 polymorphism (25). To avoid another metabolic bias in our study, we defined a bilirubin rate before treatment inferior to 1.5 X normal rate because several precedent studies showed that high bilirubin rates could be correlated with a lower irinotecan clearance by the reduction of biliary excretion (28).

A total of 90 patients were studied. With 5-FU pharmacokinetic monitoring, only a few toxic events, mainly low 1-2 grade events, were observed since only 8.7% grade 3-4 toxic side-effects and no toxic death were observed, especially diarrhoea and asthenia.

The efficacy was good with an objective response rate of 42.3%, with 7.8 % complete responses, and median overall survival and progression-free survival times of 27.4 months and 7 months respectively. The overall survival rate was 10% after 5 years, double the usual rate described in the literature for metastatic colorectal cancer (13-14).

In term of efficacy, we confirm previous results showing that survival was significantly longer for patients with a performance status of less than 2 ($p=0.001$) and younger than 75 years old ($p=0.031$).

Concerning 5-FU biomarkers, we found no impact of TYMS, MTHFR and DPYD genotypes on combination tolerance. Likewise, we found no impact of TYMS polymorphisms and expression, on tumor response, on overall and progression-free patient survival. We found only an impact of MTHFR genotype on overall survival. Clearly, the addition of irinotecan to 5-FU dramatically reduce the role of 5-FU molecular resistance factors.

On the other hand, patients with the UGT1A1*28 7/7 genotype (12 patients=13.4%), were correlated to grade 3-4 events (diarrhea, neutropenia and nausea) with a strong trend (NS) ($p=0.58$; OR 3.40; 95%CI, 0.74 to 15.60). We must keep in mind that the longer the promoter is (7/7 TA repeats) the less the enzyme is active. Interestingly, there was also a trend to a better response rate and a longer survival time for the UGT1A1*28 6/7 group of patients

compared to the 7/7 group, and it is noteworthy that the 6/6 group survival time was intermediate. We assume that UGT1A1*28 7/7 patients had a lower objective response rate (NS) ($p=0.13$; OR 0.29; 95%CI, 0.05 to 1.49). This non significant trend could be explained by the frequency of grade 3-4 toxicity in the 7/7 group, leading to repeated postponed treatments, and consequently, a loss of efficacy due to increased cycle delays. The better overall survival time median for the 6/7 group could be linked to a more appropriate dose of irinotecan ($180\text{mg}/\text{m}^2$) according to the metabolism of these patients. On the other hand, the 6/6 group was probably under-treated and could have benefited from an initial increase of irinotecan. Based on previous publications that proved that UGT1A1*28 TATAA box polymorphism ruled UGT1A1*28 glucuronoconjugation activity and SN38 half-life, we assume that this can explain that the irinotecan dosage in the UGT1A1*28 6/6 group was probably too low with an OR superior at 6/7 group (OR 0.73; 95%CI, 0.41 to 1.30). For these last patients, the initial dose of irinotecan ($180\text{mg}/\text{m}^2$) was probably better appropriated to a higher glucuronoconjugation rate.

In conclusion, the addition of irinotecan to the LV5FU2 protocol cancels out the relevance of TS or MTHFR status, the main 5-FU specific resistance or prognostic factors, as though irinotecan reverted certain mechanisms of resistance to 5-FU. This could explain certain contradictory results reported in the literature (22). Consequently the polymorphisms of TYMS and MTHFR do not have to be determined before a FOLFIRI regimen. These results do not mean that the LV5FU2 regimen should be systematically abandoned for combinations such as the FOLFIRI regimen. From previous randomised studies, it is clear that some patients benefit from LV5FU2 alone and can even experience complete remission (1-3, 13-15). Two recent multicentric randomised clinical trials compared one versus two drugs in first line therapy and showed no substantial difference in overall survival and treatment duration in the combined group, and on the contrary a higher level of toxicity with 20 to 25% grade III-IV adverse events (29-30). If treatment intensification is obviously established in patients with operable or potentially operable metastases, the question remains for patients with widespread metastases, which are clearly not operable. We probably would take advantage of determining 5-FU resistance factors prior to treatment, and individually adjust the regimen based on these parameters. Thus, in first line therapy, except in cases of selected patients, such as those with potentially resectable or curable metastatic disease, according to pretherapeutic 5-FU metabolism and resistance factors, the use of the simple, well-tolerated, and inexpensive 5-FU plus folinic acid regimen could be justified in cases of efficacy predictive factors, provided

that firstly an optimized schedule can be determined and secondly, that a switch can be made to a second line combination in case of progressive disease. Continuous infusion of 5-FU allows the use of a significantly increased dose that is well tolerated and impacts treatment efficacy (23). This could spare other drugs such as irinotecan for future lines and increase overall survival time, as hypothesized by Grothey *et al.* who reported a correlation between the number of lines of chemotherapy and overall survival, with a very well tolerated regimen and a low cost (36).

Secondly, the impact of UGT1A1*28 genotype on both tolerance and efficacy is noteworthy and should be determined pretherapeutically. The individual dose-adjustment of irinotecan based on UGT1A1*28 genotyping is presently under investigation in our institution with a clinical study that supports an increased initial dose of irinotecan of 30% (230mg/m²) in cases of 6/6 status genotype for UGT1A1*28, then a progressive intensification until 320mg/m² if no adverse events (especially diarrhoea) are reported. At the present time, preliminary results concerning the efficacy are unknown, but no severe adverse-effects have been reported after several months of an “intensive Folfiri regimen”.

Acknowledgments: We would like to thank the *Comité Départemental du Maine et Loire de la Ligue Contre Le Cancer* for their financial support.

REFERENCES

1. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate [see comments]. *J Clin Oncol* 1992; **10**: 896-903.
2. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Br Med J* 1993; **306**: 752-755.
3. Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1992; **10**: 896-903.
4. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; **20**: 191-197.
5. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J *et al.* Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affects translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 4096-4101.
6. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; **63**: 6004-6007.
7. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ *et al.* A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Clin Cancer Res* 2003; **63**: 2898-2904.
8. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A *et al.* Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; **1**: 65-70.
9. Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL *et al.* Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2832-2843.
10. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N *et al.* Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2248-2253.
11. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L *et al.* 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and Whites. *Cancer Epidemiology* 2002; **11**: 1611-1621.

12. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel, Gamelin E. Influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2008; **8**: 256-267
13. Saltz LB, Douillard JY, Pirota N, Awad L, Elfring GL, Gruia G *et al.* Combined analysis of two phase III randomized trials comparing irinotecan (c), fluorouracil (F), leucovorin (L) vs F alone as first-line therapy of previously untreated metastatic colorectal cancer (MCRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; **19**: 242a.
14. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomised trial. *Lancet* 2000; **355**: 1041-1047.
15. De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J *et al.* Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 2938-2947.
16. Haaz M.C, Rivory LP, Riché C, Robert J. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A (CYP3A) and drug interactions. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* 1997; **38**: 17.
17. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR *et al.* Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Investig* 1998; **101**: 847-854.
18. Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1501- 1518.
19. Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1*28 gene. *J Hepatol* 2000; **33**: 348-351.
20. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, del Rio E, Gomez-Pardo M and Baiget M. UGT1A1*28 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J of Cancer* 2004; **91**: 678-682.
21. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyl-transferase (UGT1A1*28) causing Crigler-Najjar and Gilbert's syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; **16**: 297-306.
22. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy ? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **57**: 835-840.
23. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Delva R, Regimbeau C, Cailleux PE, Alleaume C *et al.* Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and

- leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 1470-1478.
24. Morel A., Boisdron-Celle M., Fey L., Lainé-Cessac P., Gamelin E. Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with lethal outcome after 5-fluorouracil administration and determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clin Biochem* 2007; **40**: 11-17.
 25. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guerin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of Different UGT1A1*28 Polymorphisms in Irinotecan-Induced Toxicity: A Molecular and Clinical Study of 75 Patients. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 5151-5159.
 26. Marsh S, Collie-Duguid E, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999; **58**: 310-312.
 27. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N *et al.* Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2248-2253.
 28. Raymond E, Boige V, Faivre S, Sanderink GJ, Rixe O, Vernillet L *et al.* Dosage adjustment and pharmacokinetic profile of irinotecan in cancer patients with hepatic dysfunction. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 4303-4312.
 29. Seymour MT. Fluorouracil, oxaliplatin and CPT11 use and sequencing (MRC FOCUS): a 2135-patient randomized trial in advanced colorectal cancer. The UK NCRI Colorectal Clinical Studies Group. *J Clin Oncol* 2005; **23**(suppl 16S): 250S (abstract 3518)
 30. Bouché O, Castaing M, Etienne PL. Randomized strategical trial of chemotherapy in metastatic colorectal cancer (FFCD 2000-05): Preliminary results. *Am Soc Clin Oncol* 2007, 180S (Abstract 4069).
 31. Popat S, Matakidou A, and Houlston R. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 529-536.
 32. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 1611-1615.
 33. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, Francoual M, Magné N, Formento P *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 785-792.
 34. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A *et al.* Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; **1**: 65-70.

- 35.** Marcuello E, Altes A, Del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; **112**: 733-737.
- 36.** Grothey A. Biological therapy and other novel therapies in early-stage disease: are they appropriate? *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 6909s-6912s.

TABLES

Table I. *Patients' initial characteristics.*

Clinical data		Number (%)
Gender	Male	62 (69)
	Female	28 (321)
PS	0-1	86 (95.5)
	2-3	4 (4.5)
Median age (years)		64.5
Range (years)		23-82
Tumor site	Colon	69 (76.6)
	Rectum	21 (23.4)
Metastatic site		
Unique site	Liver	53 (58.9)
	Lung	11(12.2)
	Peritoneal Carcinomatosis	6 (6.7)
	Nodes	2 (2.2)
Number of sites > 1		18 (20)
First line of treatment		84 (93.3)

Table II. Distribution of TS and MTHFR polymorphisms in the studied population.

		Nb of patients	Frequency (%)
TS Polymorphisms	2R/2R	22	24.4
	2R/3R	43	47.8
	3R/3R	24	26.7
	2R/4R	1	1.1
TS Expression	'high'	59	65.6
	'low'	31	34.4
MTHFR 1298 A>C	A/A	37	41.1
	A/C	45	50.1
	C/C	8	8.9
MTHFR 677 C>T	C/C	45	50.0
	C/T	35	38.9
	T/T	10	11.1
DPD	2846 A>T	1	1.1
	IVS 14 + 1G>A	2	2.2
UGT 1A1	5/6	1	1.1
	5/7	1	1.1
	6/6	37	41.1
	6/7	39	43.3
	7/7	12	13.4

Table III. Distribution of the toxic side-effects in the whole population.

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total (n)
Mucositis	8	3	0	0	11
Conjunctival effects	6	0	0	0	6
Diarrhoea	26	10	5	0	41
Hand-foot syndrome	5	4	0	0	9
Cardiac effects	0	0	1	0	1
Neutropenia	34	11	4	4	53
Thrombopenia	11	2	0	0	13
Anemia	18	6	0	0	24
Nausea	26	8	0	0	34
Alopecia	16	3	4	0	23
Asthenia	48	19	7	0	74
Total (n)	198	66	21	4	289

Table IVa. Predictive factors of response and 3-4 grade toxicity: Univariate regression logistic analysis.

	Response		Toxicity		
		OR [95% CI]	p-value	OR [95% CI]	p-value
Age			0.6420		0.2635
	<75 years old	1		1	
	≥ 75 years old	1.412 [0.330; 6.042]		2.704 [0.473; 15.462]	
Performance Status			0.4865		0.4395
	0.1	1		1	
	2-3	0.441 [0.044; 4.417]		2.534 [0.240; 26.758]	
Polymorphism TS			0.9617		0.7856
	2R/2R	1			
	2R/3R	1.144 [0.404; 3.240]		1.027 [0.231; 4.567]	
	3R/3R	1.032 [0.319; 3.341]		0.576 [0.087; 3.817]	
Expression TS			0.9682		0.5950
	Low	1		1	
	High	1.018 [0.422; 2.456]		1.464 [0.359; 5.963]	
MTHFR 677 C>T			0.8425		0.7415
	C/C	1		1	
	C/T	1.125 [0.459; 2.758]		1.655 [0.460; 5.850]	
	T/T	1.500 [0.379; 5.936]		NV	
MTHFR 1298 A>C			0.4945		0.5348
	A/A	1		1	
	A/C	0.978 [0.403; 2.373]		1.031 [0.256; 4.154]	
	C/C	2.444 [0.506; 11.804]		2.750 [0.408; 18.522]	
UGT 1A1*28			0.1302		0.0583
	6/6	1		1	
	6/7	1.513 [0.618; 3.704]		0.368 [0.067; 2.021]	
	7/7	0.288 [0.055; 1.492]		3.400 [0.741; 15.604]	

Table IVb. Predictive factors of toxicity: Multivariate regression logistic analysis.

	Toxicity	
	OR [95%CI]	p-value
Performance Status		0.7355
	0.1	1
	2-3	1.591 [0.108; 23.501]
UGT 1A1*28		0.0764
	6/6	1
	6/7	0.357 [0.064; 1.988]
	7/7	3.133 [0.629; 15.609]

Table V. Predictive factors of overall survival: Cox proportional hazard regression.

	Univariate		Multivariate	
	OR [95% CI]	p-value	OR [95% CI]	p-value
Age		0,0311		0,0120
<75 years old	1			
≥ 75 years old	2,287 [1,078;4,854)		2,741 [1,248; 6,023]	
Performance Status		0,0010		0,0008
0.1	1			
2-3	5,785 [2,027; 16,508]		6,641 [2,189; 20,144]	
Polymorphism TS		0,7437		
2R/2R	1			
2R/3R	1,280 [0,666; 2,460]			
3R/3R	1,114 [0,514; 2,413]			
Expression TS		0,7817		
Low	1			
High	1,081 [0,625 ; 1,868]			
MTHFR 677 C>T		0,8884		
C/C	1			
C/T	0,867 [0,488; 1,542]			
T/T	0,951 [0,416; 2,173]			
MTHFR 1298 A>C		0,0416		0,0114
A/A	1			
A/C	1,969 [1,134; 3,418]		2,359 [1,333; 4,174]	
C/C	0,964 [0,287; 3,245]		1,276 [0,372; 4,368]	
UGT 1A1*28		0,2621		
6/6	1			
6/7	0,734 [0,415; 1,299]			
7/7	1,370 [0,640; 2,932]			

Table VI. Predictive factors of progression-free survival: Cox proportional hazards regression.

		Univariate		Multivariate	
		OR [95%CI]	p-value	OR [95%CI]	p-value
Age			0,020		0,041
	<75 years old	1			
	≥ 75 years old	2,242 [1,150 ;5,106]		3,001 [1,048 ; 8,592]	
Performance Status			0,117		
	0.1	1			
	2-3	2,250 [0,816 ; 6,205]			
Polymorphism TS			0,089		0,100
	2R/2R	1			
	2R/3R	0,554 [0,324 ; 0,948]		1,284 [0,581 ; 2,838]	
	3R/3R	0,780 [0,426 ; 1,427]		2,376 [0,889 ; 6,353]	
Expression TS			0,005		0,005
	Low	1			
	High	0,516 [0,326 ; 0,816]		0,327 [0,150 ; 0,709]	
MTHFR 677 C>T			0,437		
	C/C	1			
	C/T	1,223 [0,768 ; 1,947]			
	T/T	0,761 [0,356 ; 1,627]			
MTHFR 1298 A>C			0,835		
	A/A	1			
	A/C	0,895 [0,564 ; 1,420]			
	C/C	1,085 [0,499 ; 2,357]			
UGT 1A1*28			0,771		
	6/6	1			
	6/7	0,981 [0,612 ; 1,571]			
	7/7	1,666 [0,394 ; 7,045]			

FIGURES.

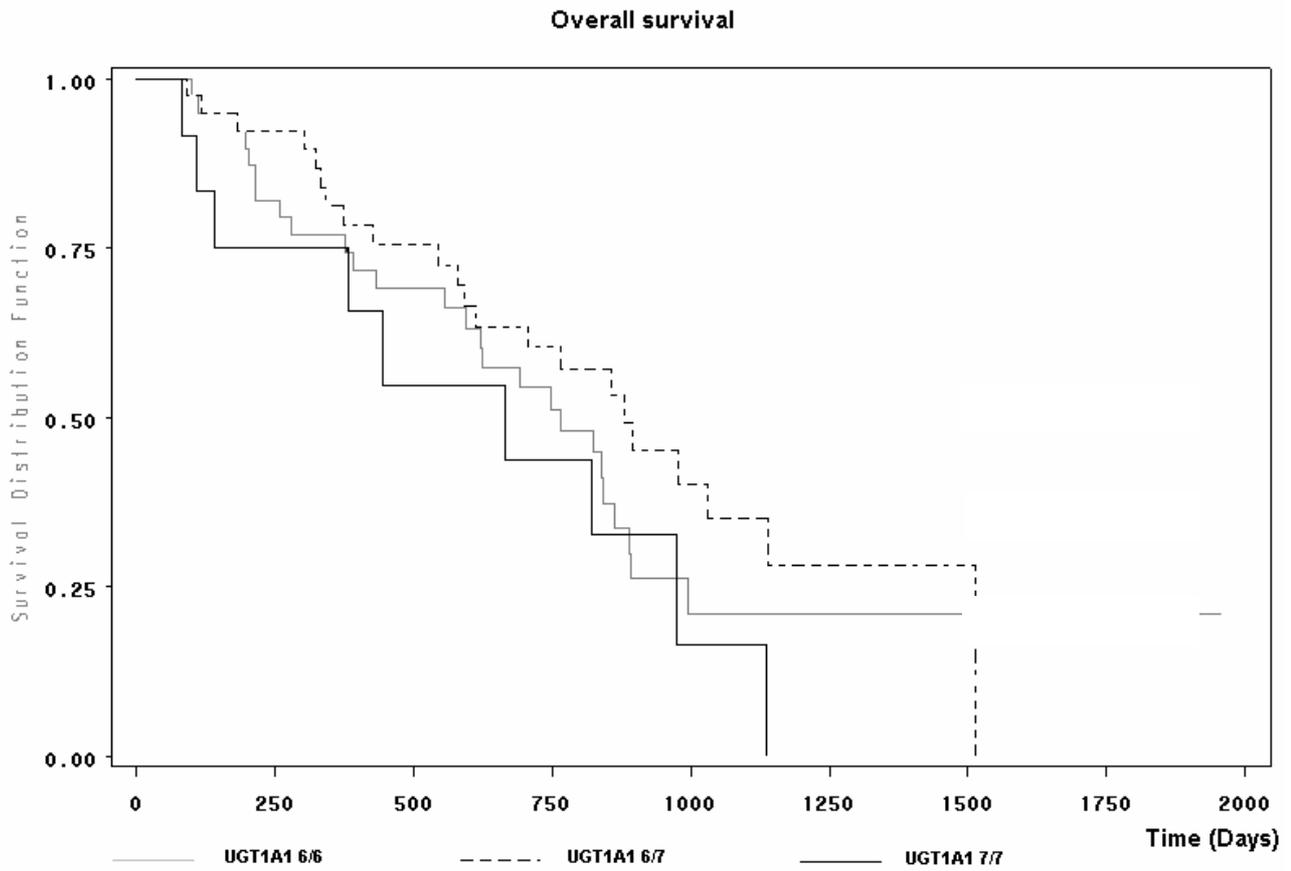


Figure 1. *Univariate overall survival of patients according to UGT 1A1 genotypes.*

APPENDICES

DPYD and MTHFR pyrosequencing.

Primers used for biotinylated PCR and annealed primers used for bioluminometric real-time sequence determination.

	SNPs	Exon	PCR Primers 5' -> 3'		Annealed Primers	Size (pb)
			Forward	Biotinylated reverse		
	IVS14+1G>A	Intron 14	atcagtgagaaaacggctgc	taaacattaccaacttatgcca	aggctgactttccaga	150
DPYD	464 T>A	5	ttatggagctgctaagatga	atcacatacctcagtagcaaa	cccattaatattggt	200
Chromosome	1679 T>G	13	aatatggagcttcgtttct	gagagaaagtttggtgagg	ccagccaccagcacatc	204
1p	2846 A>T	22	aagcactgcagtaccttgaa	tcattgtagcattaccacagtga	gcaagttgtggctatga ^{aa}	107
MTHFR	677 C>T	4	tattggcaggttacccaaa	ctcacctggatgggaaagat	agaaggtgtctgcgg	208
Chromosome	1298 A>C	7	gccaggggcaattcctctt	cttcagcatcactcactttgt	ggagctgaccagtgaag	202
1p						

Influence of pharmacogenetic polymorphisms on 5-fluorouracil and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer.

 [Print this page](#)

Sub-category:
Translational research

Category:
Colon and Rectum

Meeting:
2008 Gastrointestinal Cancers Symposium

Abstract No:
429

Author(s):
O. Capitain, A. Asevoaia, M. Boisdron-Celle, A. Poirier, P. Maillart, A. Morel, E. Gamelin

Abstract:

Introduction: The purpose of the present study was to determine genetic and pharmacokinetic factors to tailor 5-FU and Irinotecan administration and determine the impact of individual dose-adjustment in first-line chemotherapy of advanced colorectal cancer. **Patients and Methods:** from 90 patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI), 1) blood DNA samples were collected: thymidilate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase, methylene tetrahydrofolate reductase and UGT 1A1 germinal polymorphisms; 2) dihydrouracil/uracil plasma ratio and 5-FU plasma clearance were determined. They were investigated and correlated for tolerance and efficacy. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m² then tailored using pharmacokinetic monitoring. Statistical analysis used the χ^2 test, linear regression analysis and the Kaplan-Meier method. **Results:** This treatment was well tolerated with few severe toxic side-effects (8.7%). The overall response rate was 42.3%, the median overall survival and median progression-free survival were 28 and 10 months respectively. UGT 1A1 7/7 (13.4%) and certain DPD genotypes (5%) were statistically correlated with a higher risk of toxicity (26% and 100% grade III-IV neutropenia and diarrhoea) and UGT 1A1 7/7 a lower response rate (17%). The overall survival time of the patients with 3R/3R TS genotype associated with MTHFR C/C for 677 C>T or A/A for 1298A>C (20 patients=22%) was not statistically different than the other genotype. **Conclusions:** This protocole was efficient and well tolerated thank to 5-FU dose adjustment that lowered the incidence of severe toxic side-effects. For CPT11, the risk of severe toxicity was statistically higher for 7/7 group and consecutively associated with a lower response rate. DPD SNP's and UGT 1A1 genotyping combined to individual dose-adjustment with a pharmacokinetic follow-up must be considered in FOLFIRI to optimize response rate and decrease severe adverse side effects.

4. Abstract N° 3 (# 2140) ASCO GI 2010.

Paper #2140

Pharmacokinetic and pharmacogenetic approach to improve dose intensity and tolerance of FOLFIRI + cetuximab in patients with metastatic CRC.

O. Capitain, J. P. Metges, A. Adenis, J. L. Raoul, T. Lecomte, Y. H. Lam, R. Faroux, C. Masliah, V. Berger, E. Gamelin, CRLCC Paul Papin, Angers, France; Institut de Cancerologie, Brest, France; Centre Oscar Lambret, Lille Cedex, France; Centre Eugene Marquis, Rennes, France; Hôpital Trousseau, Tours, France; Centre Hospitalier, Cholet, France; Centre Hospitalier Départemental Les Oudairies, La Roche sur Yon, France; Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes Cedex 1, France; Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, Angers, France; Centre Paul Papin, Angers, France

Abstract Text:

Background: A multicenter open phase II trial has been carried out in advanced CRC combining 5FU, CPT11 and Cetuximab. Tolerance and efficacy were aimed to be improved through pharmacogenetics (dihydropyrimidine dehydrogenase DPD and UGT1A1 genotypes (UPG)) and pharmacokinetics (PK). **Methods:** pts < 80 y, 2nd or 1st line chemotherapy, PS<2, normal organ function. 5-FU dose was adjusted based on PK. CPT11 dose was adjusted according to UPG and tolerance. Doses: weekly Cetuximab (400 mg/m²D1 then 250 mg/m² dose unchanged), CPT11 biweekly, dose based on UPG: 6/6 genotype 216 mg/m² initial dose + 20% each cycle (iC) up to 300 mg/m², 6/7 genotype 180 mg/m² + 20% iC up to 300 mg/m², 7/7 genotype 125 mg/m² + 10 % iC up to 180 mg/m² or toxicity. 5FU bolus + 2400 mg/m² 46h + FA. **Results:** 104 pts were recruited, 85 pts were in second line, 19 pts in first line; UPG: 6/6; 6/7; 7/7 pts (58, 38, 8). 5FU dose: 6 pts had initial 5FU dose reduction (5 DPD partial deficiency, 1 elderly pt). Dose of 5FU infusion varied widely among patients, from 1.8g to 7g/C. CPT11: Dose intensity planned was reached for 6/6 pts, 6/7 pts. For 7/7 pts, over 75 cycles 12 increases and 5 decreases, 34 non increases. Treatment adherence: 82 pts (79%) underwent 6C, 40 pts (38%) /12C and 13 pts (12%)/18C. Toxicity: 13% of patients experienced G3 toxic side effect and 1% G4. No difference was observed based on UPG or DPD status. Response: On 87 evaluable pts, ORR 33%, SD 39% and PD 29%. No difference was observed based neither on UPG nor on DPD status. **Conclusions:** Individual dose adjustment was performed with a very good profile of tolerance. Treatment efficacy was the same whatever the UGT1A1 genotype which means that CPT11 should be increased in 6/6 patients and reduced in 7/7 ones. Major DPD deficiency is not a contraindication to 5FU provided that dose is pharmacokinetically guided. Median dose administrated (mg/m²) of CPT11 (mg/m²) and 5FU (g/m²) according to UPG

Cycle	5-FU	5-FU	CPT11	CPT11	CPT11	CPT11	CPT11	CPT11
	n	g/m ²	6/6	6/6	6/7	6/7	7/7	7/7
	n	g/m ²	n	mg/m ²	n	mg/m ²	n	mg/m ²
C1	104	4.3 (0-5.8)	58	208±21	38	179±30	8	125±2
C2	100	4.5 (1.8-5.7)	56	214±32	38	180±42	8	126±7
C6	82	4.3 (1.8-6.4)	44	256±50	30	184±54	8	127±14
C12	40	4.6 (1.9-7)	22	292±63	14	181±57	4	123±9

5. Abstract N° 4 (# 2120) ASCO GI 2010.



www.asco.org

IMPACT OF PI3K, BRAF and KRAS MUTATIONS ON EFFICACY OF INTENSIFIED FOLFIRI PLUS CETUXIMAB REGIMEN IN ADVANCED COLORECTAL CANCER.

Linot, Benjamin¹, Capitain, Olivier (MD)¹, Metges Jean Philippe (MD)², Adenis Antoine³, Raoul Jean Luc (MD,PhD)⁴, Paintaud Gilles⁵, Poirier Anne Lise¹, Boisdron-Celle, Michèle (PharmaD, PhD)¹, Morel, Alain (PhD)¹, Gamelin, Erick (MD, PhD)^{1,2}.

Background

FOLFIRI plus cetuximab, a monoclonal EGFR antibody, is a reference treatment in metastatic colorectal cancer. KRAS mutations are responsible for approximately 30% of anti-EGFR MoAb therapy failures, but several other mutations could be involved in resistance mechanism such as BRAF and PIK3 genotyping.

Methods

We prospectively analyzed statistical correlations between objective tumor response, progression-free survival time, and mutational status of KRAS, BRAF, PI3K identified by pyrosequencing in 54 patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab in combination with intensified FOLFIRI regimen. Statistical analysis used the χ^2 test, linear regression analysis, and the Kaplan-Meier method.

Results

Mutations in MAP kinases pathway were found in 42.6% (Kras: 38.9%; BRAF: 3.7%) and PI3K mutations in 38.9% (exon 9: 25.9%, exon 20: 3.7%, exon 9 and 20: 9.3%). The presence of at least one mutation (MAP kinases or PI3K) was associated with a poorer objective response to treatment ($p=.0225$) and PI3K mutations are associated with highly decreased progression-free survival time ($p=.0256$).

Conclusion

Genomic status of PI3K, KRAS and BRAF affected response and prognosis of patients treated with intensified FOLFIRI plus anti-EGFR MoAb therapy in metastatic colorectal cancer. PI3K, KRAS or BRAF activating mutations were very frequent (65% of patients) in our study. KRAS or BRAF mutations involved in MAP kinases pathway were excellent predictive biomarkers of resistance and PI3K variants were associated with a dramatic decrease of progression free survival. In conclusion, PI3K, KRAS and BRAF pretherapeutic genotyping should be considered for optimizing this combination.

III. TRAVAUX PERSONNELS

E. TROISIEME PARTIE :
OXALIPLATINE ET CANCER COLORECTAL
METASTATIQUE

Influence des paramètres pharmacogénétiques sur la tolérance et l'efficacité de l'oxaliplatine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

1. Présentation du travail

2. Discussion

3. Publication N° 3

*A multivariate analysis of pharmacogenetic biomarkers on efficacy and safety of a first line treatment based on pharmacokinetic 5-fluorouracil regimen combined with oxaliplatin (tailored FOLFOX4) in advanced colorectal cancer. Capitain O, Asevoaia A, Poirier AL, Boisdrion-Celle M, Morel A Gamelin E. **Soumis à publication.***

4. Publication N° 4

A multivariate analysis of nucleotid excision repair gene polymorphisms in patients with metastatic colorectal cancer and treated with first-line FOLFOX4 chemotherapy.

Capitain O, Asevoaia A, Poirier AL, Boisdrion-Celle M, Morel A, Gamelin E. *Soumis à publication.*

5. Publication N° 5

*Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity. The involvement of the oxalate outcome pathway. Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne le B, Gilles S, Boisdrion-Celle M, Gamelin. **Clin Cancer Research. 2007; 13(21): 6359-6368.***

1. Présentation du travail

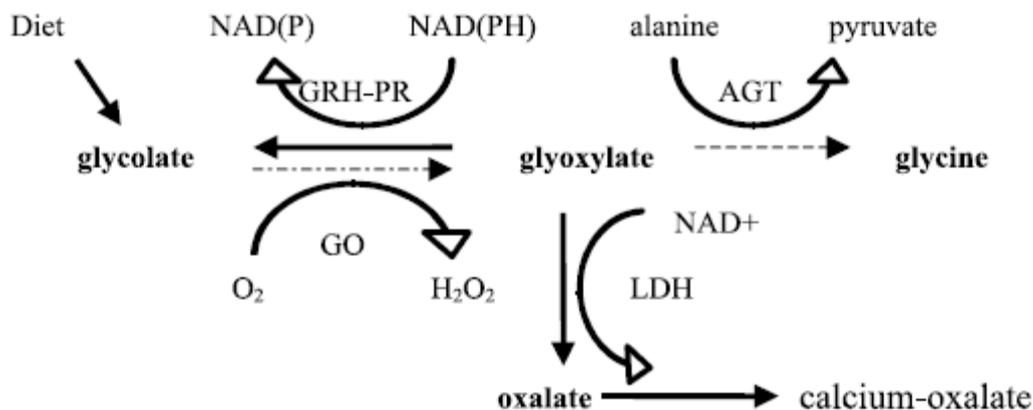
1.1 Rationnel.

Selon la même démarche qu'avec le FOLFIRI, et fort de l'expérience acquise sur l'intérêt de la recherche des polymorphismes de la TYMS et de la MTHFR lors d'un traitement par 5-FU exclusif, nous avons cherché à savoir si, au même titre que l'irinotecan, l'oxaliplatine « annulait » les effets délétaires de certains polymorphismes retrouvés au niveau de ces enzymes du métabolisme cellulaire. Nous avons bien sûr intégré l'exploration de polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans le métabolisme propre à l'oxaliplatine, polymorphismes qui pourraient expliquer au moins en partie d'une part les phénomènes de

résistance à ce cytotoxique mais également la neurotoxicité dose-limitante, et potentiellement très invalidante sur la qualité de vie des patients, très fréquemment rencontrée lors de son utilisation. Ces gènes correspondent à la Glutathion S-Transférase 1 (GSTP1) impliqué dans la voie de détoxification de l'oxaliplatine via le glutathion, et à un ensemble de protéines intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces dernières ont déjà largement montré leur responsabilité dans la genèse de plusieurs types de tumeurs notamment coliques, et de nombreux résultats, quoique souvent contradictoires ont été rapportés dans la littérature (**Voir Chapitre « Pharmacologie de l'oxaliplatine »**). Ces protéines de réparation sont impliquées dans le système dit de « Base Excision Repair » (BER) (principalement les gènes *XRCC1* (*X-ray repair cross-complementing group 1 protein*), et *OGG1*, qui codent pour des DNA glycosylases impliquées dans l'excision-réparation les groupes 8-hydroxy-2'-deoxyguanine (8-OH-dG) retrouvés lors de dommages oxydatifs (radicaux libres) au niveau de l'ADN), et le système dit de « Nucleotide Excision Repair » (NER) (*ERCC1*, et groupe de complémentation comme les gènes *XPD* et *XPF* par exemple). La famille *Excision Repair Cross-Complementing* (*ERCC*) notamment répare les dommages nucléotidiques au niveau de l'ADN en deux étapes : l'excision de la base « erreur » dans un premier temps puis son remplacement par la base correcte via l'activité de DNA polymerases/ligases. Le gène *ERCC1* (*ERCC group 1*) code pour une protéine de 297 aminoacides formant avec *XPF* (Xeroderma Pigmentosum Complementation group F, aussi appelé *ERCC4*) un complexe actif requis pour la réparation des erreurs de combinaisons comme des erreurs nucléotidiques. Plusieurs études translationnelles ont cherché à mettre en évidence des corrélations de réponses, ou non (= résistance) au traitement par oxaliplatine à certains polymorphismes de ces gènes, mais là encore les résultats sont souvent difficiles d'interprétation rendant trop précoce leur mise en œuvre en pratique courante. Le caractère contradictoire de ces études peut s'expliquer cependant par plusieurs observations simples : des études portent sur l'ADN germlinal et d'autres sur l'ADN tumoral ce qui rend peu lisibles les résultats ; les faibles effectifs en général de ces études, ce qui rend leurs interprétations souvent non statistiquement significatives ; le caractère très hétérogène des tumeurs explorées (estomac, ovaire, poumon, colon, etc...); et le fait que le système de réparation, très complexe, fait intervenir de multiples partenaires : plutôt qu'un gène dont le polymorphisme serait déterminant, c'est un ensemble de coacteurs qu'il faudrait probablement prendre en considération. De plus, un même polymorphisme peut entraîner la résistance par réparation « améliorée » des lésions induites par l'oxaliplatine (adduits), mais également favoriser l'apoptose quand des lésions de plus grande ampleur sont définitivement irréparables. Enfin et à ce propos, des mutations

d'aval au niveau justement des mécanismes apoptotiques (par exemple Bax) peuvent « inhiber » *in fine* le bénéfice d'une réparation de « mauvaise qualité » induite par des polymorphismes de « bon pronostic » (s'entend comme ne réparant pas correctement ou de façon moins efficace les lésions induites par le cytotoxique) (**Voir Figure 25 page 88**).

Dans l'hypothèse éventuelle de l'implication au niveau neuronal de ces mécanismes de réparation pouvant être responsables, au moins en partie, de la neurotoxicité à l'oxaliplatine, nous avons également cherché à corréliser les différents polymorphismes étudiés avec les grades de toxicités des neuropathies observées chez nos patients. Compte-tenu de la grande multiplicité des gènes et des polymorphismes étudiés dans le cadre de cette recherche de déterminants génétiques prédisposants (ADN germlinal) sur les réponses et les toxicités à l'exposition d'un traitement de type FOLFOX4 combinant 5-FU/Acide folinique et oxaliplatine, il nous a paru opportun d'écrire deux publications distinctes à partir cependant de la même base de données clinicobiologiques concernant une population homogène de patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique et non prétraités. **La publication N°3** reprend également une autre voie de recherche translationnelle ouverte par les résultats d'une étude préliminaire (**Publication N°5**) : l'éventuelle responsabilité dans la physiopathologie des neurotoxicités de l'oxalate, un des métabolites de l'oxaliplatine (**Voir Chapitre « Pharmacologie de l'oxaliplatine »**), et chélateur du calcium, calcium lui-même impliqué dans le fonctionnement des canaux sodiques voltage-dépendant retrouvés au niveau axonal. Le métabolisme de l'oxalate implique une enzyme, l'alanine glyoxylate aminotransférase (AGXT), dont l'un des haplotypes (mineur) pourrait être un facteur prédisposant à l'apparition et à la sévérité des neurotoxicités aiguës comme chroniques (**Figure 41**).



Figure

41. Métabolismes de l'Oxalate et du Glyoxylate.

Le glyoxylate est le produit de la sérine, glycine et alanine après métabolisation par le foie pour la production de glucose. Il existe trois voies de détoxification dont la voie de l'alanine glyoxylate aminotransférase (AGXT), qui a lieu exclusivement au niveau des peroxysomes avec transformation en glycine lors d'une réaction couplée avec conversion de l'alanine en pyruvate. Les deux autres réactions ont lieu dans le cytosol et notamment celle de la transformation du glyoxalate en oxalate via la lactate déhydrogénase (LDH). Il existe des variations génétiques au niveau de l'AGXT avec possibilité de diminution de son activité enzymatique (jusqu'à 30%) et donc accumulation d'oxalate par la « voie de secours » à des taux « limites » : l'homéostasie neuronale entre autre, pourrait être perturbée dans ces conditions par l'apport massif d'oxalate dérivé métabolique de l'oxaliplatine délivré lors des cures de chimiothérapies de type FOLFOX4. L'effet neurotoxique de l'oxalate est en effet bien connu, par exemple dans le cadre d'intoxication à l'Ethylène Glycol. Sa capacité à chélater le calcium comme le magnésium pourrait expliquer des dérèglements ioniques au niveau des neurones via la perturbations du fonctionnement des canaux sodiques calcium-dépendants comme rapportés par notre équipe et d'autres (**pour la bibliographie, se reporter à l'article N°5**). Ces perturbations ioniques sont visibles sur les prélèvements urinaires réalisés dans une étude préliminaire et citée **dans l'article N°5** : Une augmentation conséquente du taux d'excrétion urinaire d'oxalate mais aussi de calcium, sodium et magnésium était mise en évidence chez les dix patients sélectionnés (**Tableau XII**).

Tableau XII. Taux plasmatiques et urinaires après perfusion d'oxaliplatine à h+5 et J8 et J15.

	<i>n</i>	D1 H0	D1 H2	D1 H5	D8	D15
Plasma concentration						
Calcium (mmol/L)	37	2.28 ± 0.09	2.31 ± 0.1	2.3 ± 0.09	2.28 ± 0.09	2.27 ± 0.08
<i>t</i> test				NS		
Magnesium (mmol/L)	37	0.79 ± 0.07	0.81 ± 0.12	0.76 ± 0.07	0.8 ± 0.08	0.76 ± 0.11
<i>t</i> test				NS		
Potassium (mmol/L)	37	3.68 ± 0.29	3.77 ± 0.34	3.79 ± 0.4	3.67 ± 0.38	3.47 ± 0.37
<i>t</i> test				NS		
Concentration in urine/creatinine						
Oxalate (µmol/mmol)	31	18.6 ± 13.88		54.5 ± 50.5 ↑ × 2.9	10.1 ± 8.1 ↓ × 1.8	15.8 ± 14.5
<i>t</i> test				<i>P</i> = 0.006		
Calcium (mmol/mmol)	36	0.34 ± 0.22		0.63 ± 0.34 ↑ × 1.8	0.3 ± 0.23 ↓ × 1.1	0.32 ± 0.19
<i>t</i> test				<i>P</i> = 0.003		
Magnesium (mmol/mmol)	32	0.23 ± 0.15		0.39 ± 0.28 ↑ × 1.65	0.21 ± 0.12	0.19 ± 0.13
<i>t</i> test				<i>P</i> = 0.009		
Potassium (mmol/mmol)	36	5.96 ± 2.26		10.16 ± 4.25 ↑ × 1.7	5.29 ± 1.71 ↓ × 1.2	4.97 ± 1.89
<i>t</i> test				<i>P</i> = 0.003		
Sodium (mmol/mmol)	36	16.09 ± 7.46		22.97 ± 12.1 ↑ × 1.42	10.0 ± 7.1 ↓ × 1.6	12.3 ± 5.62 ↓ × 1.3
<i>t</i> test				<i>P</i> = 0.001		

Ces variations ioniques et leurs implications sur les canaux-voltage neuronaux justifient des tentatives d'amélioration des tableaux cliniques de neuropathies, ou en tout cas de leur prévention par l'administration systématique de perfusion de gluconate de calcium et de sulfate de magnésium avant et après perfusion d'oxaliplatine avec des résultats tout à fait encourageants quoiqu'encore sujets à controverse [172-173]. Une publication très récente de Sakurai *et al*, sur un modèle animal (rat), rapporte cependant la très probable implication de l'oxalate sur les neuropathies aiguës (au froid) mais non sur les neuropathies chroniques (où le dichloro-DACH platinum - autre métabolite de l'oxaliplatine -, molécule en développement industriel de phase I actuellement, serait plutôt montré comme premier responsable, bien que n'ayant aucun effet sur les canaux ioniques : d'autres mécanismes sont donc à explorer dans ce sens) [174].

Enfin dans l'étude présentée en **publication N°5**, aucune corrélation n'a été rapportée entre toxicités induites par l'oxaliplatine et les polymorphismes étudiés au niveau de certaines protéines d'efflux telles que ABCC2.

En tous les cas, les résultats des **publications N°3 et N°4** seront discutés ensemble puisqu'elles visent le même objectif, ont le même rationnel et se basent sur la même cohorte de patients.

1.2 Résultats.

Ainsi ces deux études rétrospectives monocentriques ont étudié une population de patients porteurs d'un cancer colo-rectal en situation métastatique sur une période allant de Novembre 2000 à Janvier 2007. **118 patients ont été inclus**. Le suivi médian était de 4 ans environ. La moyenne d'âge était de 65 ans, correspondant aux données épidémiologiques, avec des extrêmes entre 35 et 81 ans. Tous les patients étaient traités en première ligne métastatique. La majorité des patients était en bon état général à l'initiation du traitement avec un performance status < ou égal à 2. 69% d'entre eux avaient un site métastatique unique qui étaient dans 82% des cas des localisations hépatiques. Il n'existait majoritairement pas d'atteinte hépatique biologique, notamment la bilirubine était normale dans tous les cas. L'ACE était élevé (facteur de mauvais pronostic) au diagnostic dans 70,3% des cas. 83,9%, 40,7% et 15,3% des patients ont bénéficié d'une seconde, troisième et quatrième ligne respectivement. Le schéma FOLFIRI a été dans 51% des cas celui de la deuxième ligne, et

52,5% des patients ont bénéficié d'une ou de plusieurs thérapies ciblées (notamment du bevacizumab et du cetuximab) pendant une des lignes qui ont suivi le protocole FOLFOX4. Enfin l'oxaliplatine a pu être réintroduit en troisième ou quatrième ligne, et après résolution des toxicités neurologiques, dans 11% des cas. Finalement 24,6% des patients ont également bénéficié d'un traitement par 5-FU en monothérapie soit per os soit intraveineux.

La répartition des différents génotypes correspondait aux données de la littérature et aux lois d'équilibre de Hardy-Weinberg. Particulièrement et concernant le codon 118 (AAC) du gène ERCC étaient retrouvés 16,1% et 37,3% respectivement d'homozygotes pour C/C et T/T (46,6% étaient donc hétérozygotes pour ce locus). Chacune des sous-populations étudiées étaient homogènes entre elles et selon les critères d'âge, de sexe et d'état général, autorisant des études statistiques de corrélation uniquement basées sur les variables cliniques (réponses et survies) et génétiques (polymorphismes) libérées des risques d'interaction avec ces facteurs (âge, PS,...) bien connus de pronostic dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques.

En ce qui concerne l'étude des toxicités: 386 évènements toxiques ont été rapportés, dont 79,8% de faible grade 1-2, essentiellement de l'asthénie (17,4%) et des évènements hématologiques : 11,1% de neutropénies dont 9,3% de grade 4, des thrombopénies (9%) dont une seule de grade 4 et enfin 10,4% d'anémies. L'adjonction de G-CSF a été rendue nécessaire par des épisodes de neutropénies fébriles dans 21,2% des cas. Aucun cas de toxicité cardiaque n'a été rapporté dans ces études. Enfin et concernant les patients avec DPYD mutée (4), les effets toxiques du traitement et notamment les effets secondaires spécifiques du 5-FU étaient rares avec seulement 3 mucites de grade 3 et aucun syndrome main-pied ni diarrhées (après contrôle adaptatif de doses de 5-FU), ce qui est tout à fait remarquable.

Concernant spécialement la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine, elle représentait 27,7% des évènements indésirables rapportés mais était observée chez près de 91% des patients. Un tiers de ces neuropathies étaient de grade 3.

Les posologies de l'oxaliplatine ont du être diminuées d'au moins 20% dans un tiers de la population pendant le séquentiel de traitement qui a dû être interrompu chez 50% des patients du fait de toxicités sévères (grade 3-4) : dans 57,6% des cas pour neurotoxicité et dans 37,3% pour complications hématologiques (surtout des thrombopénies, puisque les neutropénies étaient « rattrapées » par l'utilisation de G-CSF).

En analyse multivariée, deux variables étaient significativement liées au risque de neurotoxicité : le statut C/T pour ERCC1 118 C>T apparaissait ainsi comme un facteur de risque de neurotoxicité avec un Odd Ratio (OR) à 2,86 dans **la publication N°3** (p=0,013 ; IC 95% 0,86 à 9,55) et un Odd Ratio à 2,21 (ce ne sont pas les mêmes variables qui ont été étudiées d'où les différences) dans **la publication N°4** (p=0,025 ; IC 95% 0,78 à 6,48). Le statut C/C était protecteur par rapport aux deux autres génotypes dans **la publication N°3**, en analyse univariée (p=0,02). Le génotype C/C pour XPD 751 A>C (20 patients = 17% de la population) apparaissait de très prédictif : OR 4,0 (p=0,03 ; IC 95% 1,37 à 11,94). 50% de ces patients (10) ont ainsi présenté des neurotoxicités de grade 3 (**Publication N°4**).

Les études d'efficacité du traitement retrouvaient un taux de réponse objective de **77,1% à 3 mois et 55,7 % à 6 mois avec 2,5% et 20,3% de réponses complètes respectivement.**

31,3% de chirurgies des métastases ont pu être secondairement réalisées avec une médiane de survie de 38,2 mois dans ce cas contre 16,6 chez les patients non opérés.

Finalement le traitement par FOLFOX4 avec adaptation pharmacocinétique de doses de 5-FU a contrôlé la maladie dans près de 88% des cas à 3 mois avec encore 77% de Disease Control (DC) à 6 mois, taux bien supérieurs à ceux précédemment décrits dans la littérature (**voir Chapitre « Cancer colorectal et Chimiothérapie »**).

Aucun résultat statistiquement significatif en analyse univariée n'a pu être dégagé des taux observés de réponses et en fonction des différents génotypes.

Les taux de survies globales étaient de 76,7%, 30,6% et 12,5% à 1, 3 et 5 ans. La survie globale médiane était de 23,1 mois et le temps médian de survie sans progression de 9,3 mois. Le taux était de 10% de survie à 5 ans ce qui correspond aux données actualisées de la littérature. Considérant les différents génotypes étudiés, les patients homozygotes C/C pour GSTP1 341C>T avaient une meilleure survie sans progression que les patients C/T ou T/T : 9,4 mois versus 7,0 respectivement (p=.02) en régression univariée selon le modèle de Cox. Concernant la génotypes de la région enhancer pour TYMS (5'UTR), les survies sans progression et globale étaient statistiquement et paradoxalement plus courtes pour la population 2R/2R que 2R/3R ou 3R/3R (p=.013 and .015 respectivement). Les patients C/C et C/T pour XRCC1 (Arg399Gln) avaient en univariée de meilleures survies sans progression et globale que la population T/T (p=0,0072 et p= 0,0027 respectivement). Ceci n'était pas retrouvé en analyse multivariée (**Publication N°4**).

En analyse multivariée et en excluant les patients opérés secondairement de leur métastases, les groupes 2R/3R and 3R/3R pour TYMS apparaissaient de nouveau avec un meilleur pronostic que la population 2R/2R ($p=.02$; OR 0.59; CI95% 0.36 to 0.94 and $p=.006$; OR 0.52; CI95% 0.32 to 0.83 respectively) en contradiction avec les études précédemment publiées. De façon intéressante, les groupes C/T et T/T pour GSTP1 341C>T avaient une plus mauvaise survie sans progression que la population C/C ($p=.006$; OR 2.07; CI95% 1.22 to 3.49), et les patients homozygotes T/T pour MTHFR 677C>T une tendance à une meilleure survie globale ($p=.056$; OR 0.57; CI95% 0.33 to 1.01). Finalement en considérant les variants à haut risque de progression, c'est à dire C/T or T/T pour GSTP1 341C>T et 2R/2R for TYMS, nous avons combiné deux populations parmi les 118 patients de l'étude: soit sans aucun génotype à risque (group 0, 78 patients (66.1%)), soit avec au moins un génotype à risque (group 1, 40 patients (33.9%)). Les survies sans progression étaient de 9,6 et 7,1 mois respectivement et les survies globales de 25.6 and 18.6. L'impact négatif pour les génotypes à risque sont visibles sur les courbes de Kaplan-Meier ($p=0,06$).

2. Discussion

Nous démontrons une nouvelle fois dans cette étude portant sur 118 patients, l'intérêt de l'adaptation pharmacocinétique de doses de 5-FU mais combinée ici à l'oxaliplatine. Le schéma FOLFOX4 adapté obtient ainsi des taux de réponses tout à fait excellents par rapport aux données déjà publiées (Voir chapitre II.1) avec des maladies contrôlées dans 9 cas sur 10 à 3 mois et dans presque 8 cas sur 10 à 6 mois. Les survies globale et sans progression étaient de 23,1 et 9,3 mois respectivement. Dans un tiers des cas une chirurgie secondaire a pu être réalisée sur les métastases transformant le pronostic des patients : Survie globale médiane de 38,2 mois dans ce cas. Ces excellents résultats pour un schéma de traitement non combiné à une thérapie ciblée sont corrélés à des taux de toxicités tout à fait acceptables : environ 20% de grade 3-4 ce qui est très inférieur aux taux habituellement rapportés dans la littérature. Les patients présentant une mutation de la DPYD n'ont présenté aucune toxicité sévère par le management pharmacocinétique après diagnostic phéno- et génotypique préthérapeutique. Concernant la population générale, les toxicités rapportées étaient relativement gérables (via l'adjonction de G-CSF pour les neutropénies) ou au contraire plus contraignantes, imposant la diminution des posologie de l'oxaliplatine (chez un tiers des patients) voire l'arrêt complet du traitement : thrombopénies et surtout neurotoxicité (9 patients sur 10, 30% de l'ensemble des

toxicités), cette dernière étant responsable de 50% des cas d'interruption du schéma thérapeutique.

Une telle modalité de traitement par « FOLFOX4 adapté » devrait ainsi être considérée, et généralisée au besoin, afin d'améliorer l'index thérapeutique du « FOLFOX4 standard » notamment dans les cas où les thérapies ciblées ne peuvent être employées :

- ✓ Mutations du gène Kras (de Braf ? et de PI3K ? voir *chapitre précédent*) pour les thérapies anti EGFR (cetuximab/panitumumab), mutations retrouvées chez environ 40 % des patients (près de 80% des patients (!) si l'on considère Braf et PI3K dans notre étude sur 54 patients) ;
- ✓ contre-indications ou effets secondaires quant à l'utilisation du bevacizumab (HTA non contrôlée, syndrome néphrotique, saignements actifs, thromboses, antécédents d'IDM, etc...).

Par ailleurs des situations cliniques, telles que la gestion des patients âgés ou les cas de maladies définitivement inopérables, pourraient également tirer profit d'un schéma offrant un très bon contrôle des symptômes avec un moindre risque de toxicité.

D'autre part, des considérations pharmaco-économiques justifient de ce type de schéma thérapeutique permettant d'obtenir des résultats équivalents à ceux d'autres traitements, eux combinés à des thérapies ciblées, dont le coût peut être prohibitif dans certains pays et dont le justificatif peut se discuter en situation très clairement palliative, problème d'actualité actuellement soulevé par les compagnies d'assurance aux Etats-Unis. Ceci sans compter les économies réalisées en termes de gestion des effets secondaires (soins de support, hospitalisations itératives, etc..).

Enfin au vu de nos observations, l'adjonction aux thérapies ciblées d'un traitement cytotoxique combiné mais très clairement « intensifié » par son rationnel adapté au profil et au métabolisme du patient, ne peut aboutir qu'à des résultats encore maximalisés, notamment sur les taux de réponse, offrant ainsi de nouvelles possibilités radiochirurgicales et de réelles chances de guérison. Un tel schéma pourrait se comparer à des traitements intensifs de type FOLFIRINOX mais avec un niveau de toxicité cette fois acceptable pour le plus grand nombre et non pour des patients très sélectionnés (sujets jeunes, bon état général, maladie localisée au niveau hépatique ou pulmonaire, ...).

Concernant les potentielles interactions entre neurotoxicité à l'oxaliplatine et génotypes, nous avons mis en évidence dans nos deux études parallèles, deux polymorphismes à haut risque de développer des événements secondaires de grade 3-4 altérant la qualité de vie des patients : le statut C/T (et dans une moindre mesure T/T) pour ERCC1 118 C>T (**Publication N°3**) et le statut C/C pour XPD 751 A>C (**Publication N°4**).

L'oxaliplatine présente deux types de toxicités sur le plan neurologique. *La première « aigue »* intervenant dans les premières heures suivant la réalisation de la cure chez près de 90% des patients et incluant des paresthésies acrales (voire oropharyngées) déclenchées et accentuées par le froid ; *la seconde « chronique »* caractérisée par une perte de sensibilité et par des atteintes fonctionnelles et motrices après un temps variable d'exposition à l'oxaliplatine et dont la régression peut être très longue voire impossible, grevant très clairement la qualité de vie des patients avec atteintes des gestes fins de la vie quotidienne tels que l'écriture, le boutonnage, le laçage etc... Ces atteintes peuvent également être profondes, proprioceptives, avec notamment instabilité à la station debout et marche non assurée avec augmentation du polygone de sustentation. Les paresthésies au froid sont pathognomoniques de l'oxaliplatine et ne sont pas liées à des atteintes objectives et morphologiques des nerfs périphériques (**Voir Chapitre « Pharmacologie de l'oxaliplatine »**). Notre équipe et d'autres ont au contraire pu montrer *in vitro* comme *in vivo* chez le patient, l'implication dans ce type de toxicité de l'oxalate via les canaux sodiques voltage-dépendants, même si l'ensemble des mécanismes restent peu clair et la physiopathologie non univoque. Dans le contexte de cette hypothèse et des résultats d'études préliminaires, le rationnel de l'administration-prévention avant et après chacune des injections d'oxaliplatine, de gluconate de calcium et de sulfate de magnésium, est justifié, même si des controverses ont pu émerger sur le risque de diminution du contrôle de la maladie par cette méthode (interférence avec l'efficacité de l'oxaliplatine) [175], crainte par la suite néanmoins démentie par les conclusions définitives de l'étude américaine (CONCEPT Study) dont les résultats préliminaires avaient pu faire craindre, dans un premier temps en tout cas, un effet négatif de l'apport calcique (**Présentation orale à l'ASCO GI 2008 sans publication par la suite**).

Par ailleurs, l'oxaliplatine, comme le cisplatine, induit des dommages neuronaux, l'inhibition de l'influx nerveux, et une atrophie sélective d'une sous-population de neurones des ganglions spinaux, situés hors du SNC, en périphérie, et donc non « protégés » par la barrière méningée, ou hémato-encéphalique, et ses systèmes de détoxification spécifique (protéines d'efflux

comme ABCC2 par exemple) [176-177]. *Cette toxicité neurologique « chronique »* pourrait par contre être reliée au dichloro-DACH Platinum, autre dérivé de l'oxaliplatine [174]. Alors que la toxicité aiguë est rarement invalidante (plus de 95% de grade 1 et spontanément résolutifs au-delà de 24 heures), en dehors de rares cas de neuropathies de grade 3-4 (type laryngospasme), la toxicité chronique est, elle, potentiellement sévère (grade 3-4 fréquents), difficilement résolutive, dose-dépendante, dose-limitante, et finalement non régressive, une fois installée, par les perfusions de calcium/magnésium. Cette toxicité semble atteindre la fonction neuronale elle-même sans être liée à une atteinte de l'homéostasie de ces cellules. Partant de ces hypothèses de travail, les résultats de nos études tendent à les conforter en individualisant deux protéines majeures de la réparation dans le système « NER », particulièrement impliqués dans les lésions par adduits liées aux sels de platine (cisplatine et oxaliplatine), que sont ERCC1 et XPD. *Ce sont, à notre connaissance, les premières études corrélant directement des protéines de réparation de l'ADN avec les neurotoxicités induites par l'oxaliplatine.* D'autres études translationnelles avaient en effet rapportés des résultats concernant les survies sans progression dans différentes tumeurs (dont des tumeurs coliques) et des polymorphismes géniques de ERCC1 et XPD, sans toutefois retrouver d'éléments de corrélations statistiques avec les neurotoxicités [178-185].

Nous n'avons nous-même pas retrouvé d'interaction entre les polymorphismes de l'AGXT, contrairement aux précédents travaux de notre laboratoire (**voir publication N°5**), ceux de GSTP1, et l'incidence de toxicités neurologiques sévères du fait de l'utilisation systématique pendant notre protocole d'étude de perfusions de calcium et de magnésium.

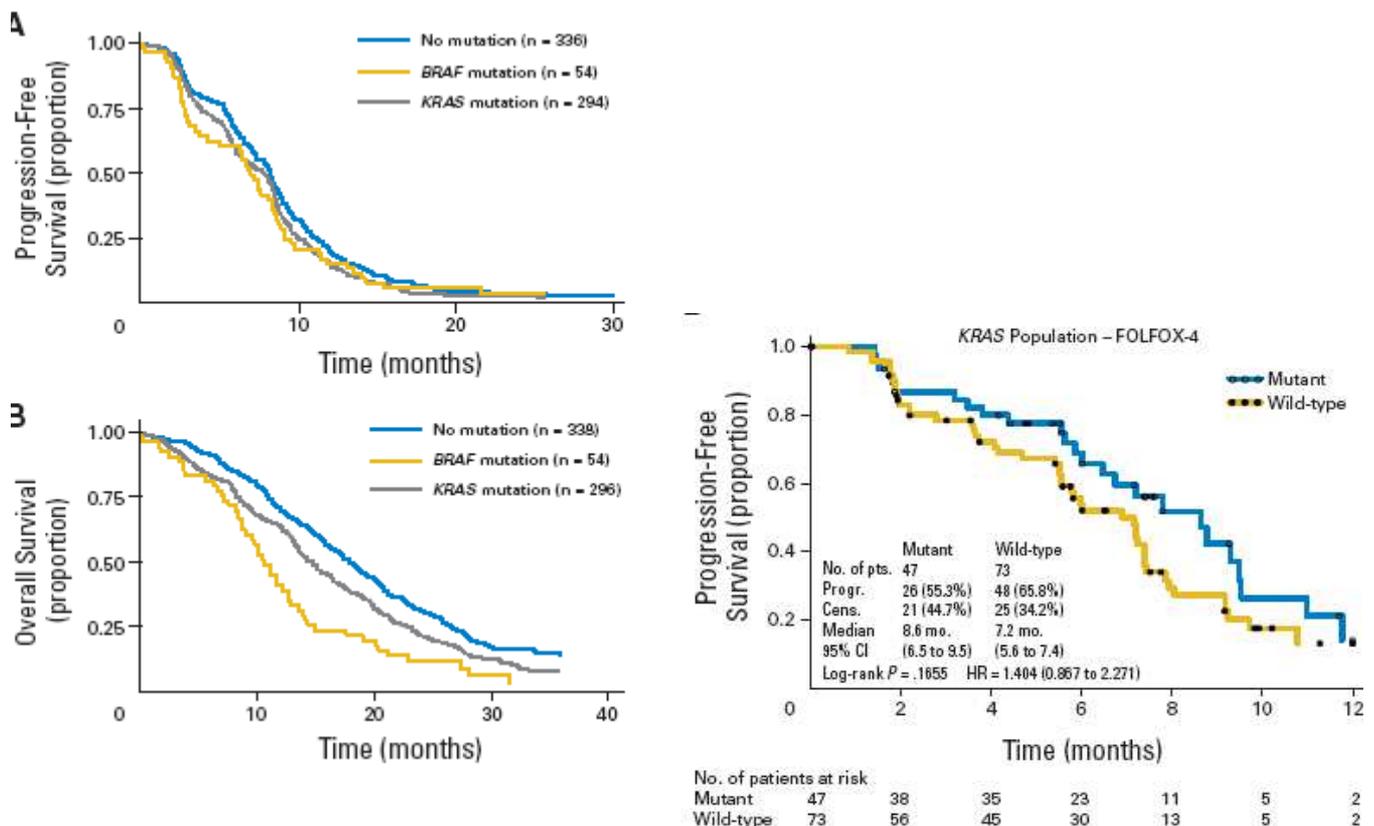
Pour expliquer de tels résultats, nous faisons l'hypothèse que la neurotoxicité chronique n'est peut être pas liée à un problème ionique via les canaux calcium-dépendant (et donc à des variations d'activité enzymatique de AGXT), ni à une accumulation intracellulaire d'oxaliplatine par déficit de fonctionnement des systèmes de détoxification médiés par le glutathion (et donc les polymorphismes de GSTP1), mais bien à une toxicité sur l'ADN des neurones périphériques, par les adduits de sels de platine ; toxicité encore favorisée par des systèmes de réparation « défaillants » face à une agression massive par la chimiothérapie « oxaliplatine », sans être pour autant délétaire pendant la vie de l'individu en condition normale d'homéostasie cellulaire. Ces anomalies ADN induites par l'oxaliplatine pourraient aboutir à des mécanismes de stress cellulaire « sidérant » les neurones périphériques sensitifs et désorganisant leurs fonctions dans les messages neuroceptifs envoyés vers le système nerveux central via les cornes postérieures médullaires. Les polymorphismes « mutés » ou

« hétérozygotes » de ERCC1 118 C>T et XPD 751 A>C aboutissent *in vitro* à une diminution d'activité enzymatique (quantitativement et/ou qualitativement) de chacune de ces protéines expliquant possiblement, sous traitement prolongé, les manifestations cliniques observées, et surtout leurs faibles réversibilités, ces lésions ADN étant définitives si non réparées. Cette hypothèse est en partie, peut-être, corrélée à l'observation d'une meilleure survie sans progression (**Publications N°3 et 4**), 10,1 mois versus 8,0 pour la population C/C ou C/T, tendant à la significativité ($p=0,068$), chez les patients homozygotes mutés ERCC1 118C>T T/T, que l'on pourrait comprendre par une toxicité accrue de l'oxaliplatine sur les cellules cancéreuses par les mêmes mécanismes de défauts de réparation, mais au niveau de l'ADN tumoral cette fois, que ceux retrouvés possiblement au niveau des ADN neuronaux « sains » des ganglions spinaux. Cette augmentation d'efficacité de l'oxaliplatine est très nettement visible si l'on considère la répartition des génotypes ERCC1 dans la population de patients « bon répondeurs » (c'est à dire présentant des réponses objectives (RC+RP) selon les critères RECIST) après 6 mois de traitement : C/C 15%, C/T 38% et T/T 46%.

Enfin, et considérant justement ERCC1, il est important de souligner qu'à l'inverse de cas de mutations (comme T/T pour 118 C>T) induisant une diminution d'activité de réparation et donc - semble-t-il - une plus grande efficacité (mais au prix d'une toxicité neuronale accrue), d'autres facteurs pourraient interagir à l'inverse sur un surcroît d'activité avec le risque de résistance à l'oxaliplatine. Ce problème a été soulevé et exploré *in vitro* (sur NIH 3T3, cellules embryonnaires fibroblastiques de souris, et MCF-7, cellules tumorales mammaires humaines) par l'équipe de Youn CK *et al* [186], avec une étude fondamentale rapportant l'implication de l'activation des voies de transduction MAP Kinases (dont H-Ras, proche de Kras) non seulement dans la progression tumorale mais également dans la résistance aux sels de platine via l'induction de la transcription du gène ERCC1. Depuis ces travaux (2004), la mise en évidence de l'implication des mutations Kras comme facteur de mauvais pronostic sur la survie dans les cancers colorectaux comme bronchopulmonaires non à petites cellules [187], mais également comme facteur prédictif de résistance à un traitement de thérapie ciblée par anticorps anti EGFR, a replacé la problématique de l'éventuel impact de ces mutations, par ailleurs très fréquentes (40% environ), sur l'efficacité d'un schéma de traitement cytotoxique « standard » et comprenant notamment (surtout) l'oxaliplatine. Une très récente étude observationnelle de Loriot *et al* [188], collectant les résultats de 6 études dans le cancer bronchique non à petites cellules et 10 dans le cancer colique, ne retrouve cependant pas de valeur prédictive négative de réponse à la chimiothérapie des mutations Kras, qui restent par

contre associées à une diminution de la survie médiane, à l'exception notable du cancer colique métastatique traité par chimiothérapie combinée à un traitement antiangiogénique par bevacizumab. Ces résultats confirment ceux d'autres études translationnelles s'appuyant sur les données de deux grands essais cliniques de phase III avec importantes cohortes de patients et réactualisées selon le statut Kras : les études OPUS, première ligne FOLFOX + cetuximab - voir page 34 - et FOCUS, monothérapie par 5-FU puis combinée versus chimiothérapie combinée d'emblée - voir page 118 (Figures 42 et 43).

Ainsi le statut muté de Kras (et de Braf [189]) ne semble donc pas interférer avec l'efficacité ou la tolérance d'un traitement par FOLFOX ou FOLFIRI [189-190].



Figures 42 et 43. Survies sans progression et survie globale en fonction des mutations de Kras et Braf dans l'essai FOCUS (à gauche)[189] et survie sans progression dans l'essai OPUS (à droite) en fonction du statut Kras [190].

L'interprétation des survies en fonction des différents polymorphismes paraît plus complexe et son rationnel plus aléatoire, tant les données sont contradictoires avec les résultats préalablement publiés concernant la TYMS notamment. Ainsi et contrairement à l'irinotecan, il semble que des paramètres liés au métabolisme propre au 5-FU (TYMS et MTHFR), jouent encore un rôle potentiel dans un schéma combiné de traitement avec

l'oxaliplatine. Le bénéfice théorique de mutations de la MTHFR (associées donc à une augmentation potentielle du stock intracellulaire de folates avec stabilisation du complexe ternaire 5-FU – TYMS – Tétrahydrofolate, **voir chapitre « Pharmacologie du 5-FU »**) comme la population homozygote T/T pour 677 C>T (avec diminution enzymatique d'environ 75%), est ainsi, dans notre étude, observée sur la survie globale, avec et après donc une première ligne de traitement par FOLFOX4 adapté, avec une tendance très proche de la significativité (p=0,056; OR 0,57; IC 95% 0,33 à 1,01). Concernant le génotypage de la TYMS, la population 2R/2R pour TSER semblent être à risque de survies moindres que les populations 2R/3R et 3R/3R, ce qui paraît très surprenant et en contradiction avec la méta-analyse de Poppat *et al* [162]. En tout cas un tel résultat confirme la difficulté d'interprétation, au moins sur le plan de l'ADN germinale, d'un tel génotypage sur le devenir prévisionnel clinique des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques ; après plus de 10 ans d'exploration la TYMS, de régulation très complexe et adaptative, ne paraît toujours pas être un marqueur sensible et pertinent dans les démarches de corrélation clinique/réponse/génotype **hors traitement exclusif par 5-FU**, où son rôle prédominant en tant que cible principale, reste une voie de recherche majeure dans la compréhension des phénomènes pharmacogénétiques.

En conclusion, un schéma FOLFOX4 adapté à la pharmacogénétique montre un haut niveau d'efficacité tout en étant associé à un taux de toxicité tout à fait acceptable. Il devrait donc être systématiquement considéré tant en situation adjuvante que métastatique, *a fortiori* si l'objectif est l'obtention d'un taux de réponse élevé, à obtenir de façon rapide, et ce enfin d'envisager dans des conditions prédéfinies, les meilleures possibilités de traitements complémentaires par exérèse-destruction des métastases, potentiellement curateurs.

La toxicité aigüe de l'oxaliplatine semble être médiée par des mécanismes de perte d'homéostasie neuronale par troubles ioniques, mécanismes médiés par des altérations du fonctionnement des canaux calcium-dépendants, par chélation entre le calcium - et dans une moindre mesure le magnésium -, et l'oxalate, dérivé métabolique « inactif », sur le plan cytotoxique tumoral, de l'oxaliplatine. Selon ce rationnel, des perfusions systématiques de calcium/magnésium avant et après traitement par oxaliplatine semblent justifiées et ont fait la preuve de leur intérêt en clinique tout en n'interférant pas avec l'efficacité du traitement cytotoxique lui-même.

La toxicité chronique de l'oxaliplatine semble par contre liée à des altérations génétiques, potentiellement irréversibles, dose-dépendantes, dues à la formation d'adduits sur l'ADN par le dichloro-DACH platinum, autre dérivé actif de l'oxaliplatine, et notamment au niveau des neurones sensitifs périphériques des ganglions spinaux, particulièrement exposés puisque non « protégés » par la barrière méningée et ses systèmes efficaces d'efflux des xénobiotiques agressifs. La population de patients présentant des polymorphismes homozygotes sauvages pour ERCC1 118 C>T (C/C) et XPD 751 A>C (A/A) - 16,1 et 45,7% respectivement -, deux des gènes majeurs du système « NER » particulièrement impliqué dans les mécanismes de réparation des adduits sur l'ADN provoqués par l'oxaliplatine, semblent avoir un profil pharmacogénétique favorable concernant ce type de toxicité et pourraient éventuellement bénéficier d'une intensification de doses d'oxaliplatine, dont le bénéfice et la tolérance seront à démontrer dans le cadre d'études prospectives selon le même schéma que l'essai « FOLFIRI-Cetuximab », présenté dans la deuxième partie ci-avant. Au contraire la population T/T pour ERCC1 118 C>T semble à risque accru de toxicité neurologique mais paraît tirer bénéfice, en terme de réponses objectives et de survie, de cette plus grande sensibilité à l'oxaliplatine.

Enfin il est intéressant de noter que le statut muté de Kras ne semble pas interférer avec l'efficacité ou la tolérance d'un traitement par FOLFOX ou FOLFIRI. Les résultats pharmacogénétiques présentés dans le cadre de notre travail de Thèse sont donc *a priori* applicables aux mêmes schémas thérapeutiques mais associés à des thérapies ciblées anti EGFR (si Kras sauvage). Il n'existe par contre pas de preuve formelle de l'extension de ces résultats avec une combinaison exploitant une thérapie ciblée antiangiogénique (bevacizumab). Une étude de type « FOLFIRI intensifié-Avastin » pourrait toutefois apporter des éléments de réponse sur ce sujet.

3. Publication N° 3

A MULTIVARIATE ANALYSIS OF PHARMACOGENETIC BIOMARKERS ON EFFICACY AND SAFETY OF A FIRST LINE TREATMENT BASED ON PHARMACOKINETIC 5-FLUOROURACIL REGIMEN COMBINED WITH OXALIPLATIN (TAILORED FOLFOX 4) IN ADVANCED COLORECTAL CANCER.

Capitain, Olivier (MD).^{1,2}, Asevoaia, Andreaa¹, Poirier, Anne Lise.³, Boisdron-Celle, Michèle (PharmaD-PhD)¹, Morel, Alain (PhD)¹, Gamelin, Erick (MD-PhD)^{1,2}.

¹Laboratory of Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U564

²Department of Medical Oncology and Clinical Pharmacology,

³Department of Statistics and Data Management

Centre Paul Papin, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer

49933 Angers Cedex, France.

Running Title: Fluorouracil and Oxaliplatin Efficacy and Toxicity

Corresponding author: Olivier Capitain

Address: Centre Paul Papin

Dept. of Clinical Pharmacology

INSERM U564

49033 Angers Cedex

France

Telephone: +33 241 352700

Fax: +33 241 352722

E-mail: o.capitain@unimedia.fr

Text: 19 pages

Tables: 10

Figures: 3

References: 70

Appendices: 0

Abstract: 315 words

Abbreviations: Single-nucleotide polymorphism, (SNP); 5-fluorouracil, (5-FU); oxaliplatin, (L-OHP); thymidylate synthase, (TYMS); dehydropyrimidine dehydrogenase, (DPYD); Methylene Tetra-Hydro-Folate Reductase, (MTHFR); Glyoxylate Amino-Transferase, (AGXT); Glutathione S-Transferase π 1, (GSTP1); Excision Repair Cross-Complementing group 1, (ERCC1).

ABSTRACT

5-FU/Leucovorin plus Oxaliplatin (FOLFOX-4 regimen) represents a reference combination both in adjuvant and metastatic settings of colorectal cancer treatment. The purpose of this current study was to investigate potential correlation between clinical outcome in 118 patients with advanced colorectal cancer treated by FOLFOX-4 as first line and 13 somatic polymorphisms within 6 genes involved in 5-FU metabolism pathway - Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD), Thymidylate Synthase (TYMS) and Methylene Tetra-Hydro-Folate Reductase (MTHFR) -, in oxalate metabolism - Glyoxylate Amino-Transferase (AGXT) -, in detoxification glutathione cycle - Glutathione S-Transferase π 1 (GSTP1) -, and in DNA repair mechanisms - Excision Repair Cross-Complementing group 1 (ERCC1). 5-FU dose was tailored using pharmacokinetic monitoring. In cases of DPYD relevant SNPs, the initial dose was reduced by 50%. 386 toxic events were notified with 78 graded 3-4 (20%), especially neuro- (7.5%) and hematological (10.6%). FOLFOX-4 regimen had to be stopped for severe neurotoxicity in 34 patients (29.6%). Specific grade 3-4 5-FU adverse events were rare (three grade 3 mucositis). C/C for ERCC1 118C>T was significantly observed as protective biomarker for neurotoxicity in univariate analysis ($p=.02$). Overall response rate was 77.1% at 3 months and 53.4% at 6. The median overall survival and median progression-free survival times were 23.1 and 9.3 months respectively. Secondary metastasis surgeries were carried out in 37 (31.3%) patients with a median overall survival of 38.2 months. C/C for GSTP1 341C>T group was correlated with a better median progression-free survival than C/T and T/T group: 9.4 months versus 7.0 respectively ($p=0.006$). Paradoxically progression-free and overall survival times of the patients with 2R/3R and 3R/3R for TYMS were statistically more than 2R/2R group: $p=.006$ and $.03$ respectively in multivariate Cox model. In conclusion, efficacy of tailored FOLFOX-4 was high with excellent overall response and survival rates. C/C for ERCC1 118C>T appears to be a good prognostic biomarker for neurotoxicity and should be considered in order to optimize based oxaliplatin regimens.

INTRODUCTION.

Colorectal cancer is one of the most frequent malignancies in humans. It represents a highly treatable and curable disease when localized, but unfortunately 50% of patients will experience metastatic progression associated with a poor prognosis: in this case 5-year survival is approximately 10%. In adjuvant or metastatic settings, 5-fluorouracil (5-FU) remains the corner stone of treatment either as a single agent (10 to 20% for response rate) (1) or especially in combinations. In the last decade a significant increasing to 50% for objective response with a better outcome were obtained with 5-FU based regimens associated with other synergic cytotoxic agents as oxaliplatin and irinotecan (CPT11) (2-5), and more recently with targeted therapies as bevacizumab (a recombinant monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor) (6-8) or cetuximab (an antibody inhibiting the epidermal growth factor receptor) (9-10).

FOLFOX-4 regimen, which includes bolus/infusional 5-fluorouracil with folinic acid modulation and oxaliplatin, became the most commonly used treatment in the first line for patients with metastatic colorectal cancer (11-13). Especially FOLFOX-4, as FOLFIRI regimen (with irinotecan), enable a subgroup of patients with hepatic or pulmonary metastases to undergo secondary surgery with the resultant benefit of prolonged disease-free survival and for few a real hope of cure (14-17). However chemotherapy regimens involve several toxic side effects with potentially unacceptable life-threatening events. At the present time, the detection of patients either responder or with a high risk of toxicity remains unclear, but the identification of predictive biomarkers for clinical outcome may help to define prospectively those who are more likely to benefit from the treatment (18-20).

In this way several biomolecular determinants were previously studied for colorectal cancers. **Concerning 5-FU**, three enzymes particularly involved in metabolism were identified: *Thymidylate synthetase (TYMS)*, the primary target of 5-FU, that presents a double polymorphism in its enhancer region: a 28-base pair (bp) tandem repeat sequence called 'R' within the 5'-untranslated region, with an increasing number of repeat sequences (21-22) and a common variant recently identified at the 12th nucleotide of the second repeat in the 3R allele that can stop USF-1 binding and decrease transcriptional activity (23-24). Finally high levels of TYMS could be correlated with 5-FU resistance and a poorer clinical outcome (25-27) but published data are conflicting (27) and at the present time there is no consensus on the interest of a potential pretherapeutic use.

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD), that accounts for 80% of drug clearance, is subjected to genetic polymorphism associated with a low activity level and potential severe adverse side effects to 5-FU (28); finally *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, that is also subject to a common polymorphism leading to variable activity; the most common two in Caucasians being MTHFR 677C>T and MTHFR 1298A>C (29). MTHFR is involved in the intracellular folate pool and variations in its enzymatic activity could play a key role in response under 5-FU based treatment via 5, 10-methylenetetrahydrofolate which is a cofactor for 5-FU inhibition of TYMS (30-33). For example, we have previously shown that we can easily discriminate patients with a high risk of life-threatening toxicity (DPD's Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and C/C for MTHFR 1298A>C), and with a predicted shorter survival time (3R/3R TYMS genotype associated with C/C for MTHFR 677C>T or A/A for 1298A>C) concerning only 5-FU and leucovorin based regimen (LV5FU2) (34).

Concerning oxaliplatin, several polymorphisms were identified inside genes involved either in mechanisms of neuro- and hematological toxicity, either in platinum resistance.

Oxaliplatin (Eloxatin; *trans-l*-diaminocyclohexane oxalatoplatinum, L-OHP) is the only platinum compound to show clinical activity in colorectal cancer, with a real synergic effect associated to 5-FU *in vitro* and *in vivo*. Its ability to form platinum-DNA adducts explains its antitumor activity. The main adverse side effects are hematological toxicity (especially neutro- and thrombopenia) often manageable and a peripheral sensory neuropathy (2-3, 11-13, 35).

Neurotoxicity, acute or chronic, induced by oxaliplatin is linked to potential severe effects on quality of life. Its incidence was estimated to more 70% of the patients receiving oxaliplatin (36) and so is dose-limiting for its use in long-term. Moreover this adverse side-effect can compromise patient benefit because of chemotherapy discontinuation (37). At the present time no treatment was proven in order to prevent this complication. Ca+/Mg infusions before and after oxaliplatin perfusions are investigated and could be a begin of solution (38) but call for further large studies before implementation in clinical practice. New neuroprotective agent as Xaliproden has recently used in this indication with promising results (39) but future randomized trials must be done to confirm these preliminary data and waiting for, oxaliplatin-induced neurotoxicity still remains an important problem for praticians in optimal drug managing. Thus growing efforts focusing on determinant pharmacogenetics in order to prevent in selected patients a such debilitating adverse effect were done these last years. In fact mechanisms involved in genetic disposition to develop a severe oxaliplatin-mediated

neurotoxicity remain unclear but several hypotheses have been suggested. Platinum agents affect axons, myelin sheath and glial structures of neurons especially in the dorsal root ganglia and peripheral nerves, probably through the formation of DNA adducts or DNA-adducts proteins complex disrupting nuclear metabolism. As heavy metal agent, oxaliplatin is eliminated through detoxification pathway enzymes and especially the *Glutathione S-Transferase π 1 (GSTP1)*. Several gene polymorphisms involved in this family have been investigated in translational studies with variable results (40-41). However nerve biopsy studies have shown no correlation between sensory symptoms in patients under oxaliplatin regimen and objective axonal degeneration (42).

We and other have studied another electrophysiological hypothesis than the oxaliplatin accumulation in neurons. Indeed interferences have been described with neuron voltage-gated sodium channels via oxalate, a calcium chelator metabolite. So specific research on gene polymorphisms involved in the pathway of the oxalate metabolism could have a particular predictive interest. In our previous study, a minor haplotype of *Glyoxylate AminoTransferase (AGXT)* was found significantly predictive of both acute and chronic neurotoxicity (43). Since nevertheless another biological study has shown contradictory results in a *Xenopus* oocytes model on the role of ion channels in the neuropathy genesis (44).

Another consistent problem remains the mechanisms involved in oxaliplatin-resistance. DNA adducts lead to intrastrand and interstrand cross-links which disrupt the structure of the DNA molecule inducing apoptosis. The degradation of oxaliplatin is independent of potentially varying enzyme activity but its mechanism of action on DNA as platinum agent explains potential variations in patients on responses and survival times according to under- or overexpression of DNA repair enzymes. Indeed platinum resistance is a multifactor process including transport alteration, drug detoxification (see above), DNA repair, and tolerance to damage and apoptosis (45-47). Specific DNA repair system is well known for some times to be the main way in mediating resistance (48). Several polymorphisms involved in repair pathways have been associated with a higher risk of cancer and variation in clinical outcome to chemotherapy, polymorphisms including the base excision repair (BER) system (e.g., *XRCC1* (*X-ray repair cross-complementing group 1 protein*), and *OGG1* genes which encode DNA glycosylases involved in the excision repair of 8-hydroxy-2'-deoxyguanine (8-OH-dG) from oxidatively-damaged DNA) and nucleotide excision repair (NER) system (*ERCC1*, and *complementation group as XPD and XPF* genes for example). The *Excision Repair Cross-Complementing (ERCC)* family prevent damage to DNA by modified nucleotide excision

(first step) then repair (second step via DNA polymerase activity) (49). *ERCC1* (*ERCC group I*) gene encodes a protein of 297 aminoacids forming with *XPF* (Xeroderma Pigmentosum Complementation group F, so called *ERCC4*) an active complex required in both recombinational repair and nucleotide excision repair (50).

Numerous studies have shown a correlation between *ERCC1* polymorphisms and clinical endpoints in colorectal cancers with sometimes contradictory results (51-53).

Considering these data, the purpose of the current study was to analyze from DNA blood samples a panel of 13 genetic polymorphisms within 6 genes (*TYMS*, *DPYD*, *MTHFR*, *ERCC1*, *GSTP1* and *AGXT*) involved in DNA repair and in the metabolism and detoxification of 5-FU and oxaliplatin. These genes had been chosen based on previously studies and in order to determinate genetic candidate biomarkers with potential statistically correlation between them and clinical outcome and safety parameters in advanced colorectal patients treated by combination pharmacokinetic adapted 5-FU/Leucovorin with oxaliplatin chemotherapy (tailored FOLFOX-4).

PATIENTS AND METHODS

Patients

This retrospective observational study included 118 patients treated in first-line in metastatic setting for advanced colorectal cancer according to the so-called FOLFOX-4 regimen, including 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin. To be eligible for inclusion, the patient had to be at least 19 years old, present measurable metastatic lesions, and have an estimated life expectancy of at least three months. All patients were required to have normal bone marrow and organ function before the administration of drugs. The performance status was evaluated as defined by the World Health Organization (WHO). Written informed consent was obtained from all patients before peripheral blood samples were taken for biomolecular analysis. A computed tomography scan was performed prior to treatment, and metastatic lesions were measured.

Chemotherapy regimen description

Oxaliplatin was administered every two weeks, before 5-FU treatment, for two hours. The initial dose was 85mg/m². Infusions of magnesium and calcium before and after oxaliplatin perfusion were systematically performed for each cure.

5-FU was administered for 46 hours after treatment with 200mg/m² of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m² of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m² and then tailored according to our institute's practice, using pharmacokinetic monitoring as previously described according to fluorouracil plasma concentrations after 43 hours (steady-state concentration) and dose-adjustment charts (54). In cases of DPD relevant SNPs, i.e. 2846A>T, IVS14+1G>A, 1679T>G, 464T>A, the initial dose was decreased by 50% (34). Treatment was continued until progression was documented, severe toxicity took place, or according to the patient's or doctor's decision.

Follow-Up

Every fortnight, each patient was physically examined and any adverse toxic events were evaluated and graded. Treatment efficacy was evaluated by comparing pretherapeutic metastatic lesion measurements to those remaining after 3 months of treatment, and then every 3 months. Data were collected until the death of the patient or until the termination date of the study (end-point: 19/03/2009) and any treatment administered after progression under the FOLFOX-4 regimen was recorded.

Response assessment

The response was assessed according to the 'Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group Criteria' and by reviewing computed tomography scans.

Tolerance assessment

All adverse events, especially neuropathy and hematological events were recorded and graded for severity according to NCI-CTC scales. Haemogrammes were performed every 2 weeks; electrolyte tests and tests on urea, creatinine and liver enzymes were carried out every month. In the event of significant grade 2 toxicity for 5-FU - and without pharmacokinetic recommendations for a decrease -, the dose was reduced by 10%. In cases of grade 3 toxicity or grade 2 for specific oxaliplatin-neuropathy, the treatment was interrupted until toxic manifestations were resolved and treatment was then restarted with a decrease of 25% of 5-FU or oxaliplatin respectively. Oxaliplatin was stopped if neuropathy grade 3 but 5-FU continued alone (LV5FU2 regimen) in this case. Treatment was stopped in cases of all grade 4 toxicity.

Genotyping.

Isolation of patient DNA from blood samples.

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the blood DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each sample was controlled with respect to DNA isolation by UV transillumination of ethidium bromide-stained gels from subsequent electrophoretic separation in 2% agarose. DNA was isolated from 118 subjects and was used to identify TYMS, DPYD, MTHFR, ERCC1, AGXT and GSTP1 polymorphisms. For each batch, appropriate positive and negative controls of established genotypes were assayed.

Analysis of Polymorphisms

Genotyping was performed using DNA obtained from peripheral blood. All polymorphisms were investigated using a polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR reactions contained: 50µl of reaction mix consisted of 1X PCR Buffer (pH 8.5), 2.5 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP (In vitrogen), 10 pmoles of each primer and 0.5 U of Taq DNA Polymerase. All PCR reagents were from Promega Corporation© and PCR primers were from Eurofins MWG Operon©. PCR started with initial denaturation (94°C for 2 min 30 sec, excepted TS for witch the initial denaturation is at 95°C for 10 min), ended with final extension (72°C for 5 min) and

30-35 cycles were performed in DNA Eppendorf/Mastercycler gradient (Fischer's Scientific Laboratory). The analysis of 12 studied polymorphisms (except TYMS 5'UTR) was based on pyrosequencing technology (bioluminometric real-time sequence determination): PCR products were sequenced using an automated PSQTM96 MA© instrument (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden), according to the manufacture' protocol as previously described (34). For DPYD polymorphisms, four SNPs, associated with severe DPYD deficiency, and hence with potentially life-threatening toxicity under the 5-FU regimen, were systematically analyzed: IVS 14+1G>A within intron 14, 2846A>T within exon 22, 1679T>G within exon 13 and 464 T>A within exon 5 (55). For MTHFR polymorphisms, the two commonest SNPs in the Caucasian population were analyzed: 677C>T and 1298A>C. For TYMS, we analysed simply the 28-base pair (bp) tandem repeat sequence called 'R' within the 5'-untranslated region (5'UTR) but not the second polymorphism inside the 12th nucleotide of the second repeat in the 3R. For GSTP1, ERCC1, and AGXT, previous reported polymorphisms were analyzed i.e. respectively: GSTP1 313A>G (Ile105Val), GSTP1 341C>T (Ala114Val), ERCC1 118C>T (Asn118As), ERCC1 8092C>A (3'UTR), AGXT 154G>T (Pro11Leu) and AGXT 1142A>G (Ile340Met).

For each polymorphism, the specific primers for prior biotinylated, PCR temperature profiles of amplification are detailed in the **Table I**.

Statistical analysis.

The overall survival time (OS) was defined by the period between the date of the start of treatment and the date of death, regardless of the cause. Progression-free survival (PFS) was defined by the period between the date of the start of treatment and the date of progression (clinical or radiological progression) or death. Patients without progression at the time of analysis were censored at their last available follow-up assessment. The chi-square test was used to compare the allele frequency of each variant with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium. The following baseline of well-known prognostic factors of survival, response and toxicity (number of metastatic sites (1 vs more), performance status at enrollment of study (ECOG 0 or 1 vs 2), age (< 60, 61-70 and > 70 years) and gender) in patients with advanced colorectal cancer were compared with each genotype by chi-square test or Fisher test. Prognosis factors of efficacy and safety (especially oxaliplatin induced neurotoxicity) were analysed by logistic regression. The α error risk was classically chosen at 5%. Uni- and Multivariate Cox regression model was used for correlation analysis between studied genotypes and overall or progression free survivals. Survival curves were added

(Kaplan Meier method). For Multivariate models, only genotypes and clinical parameters with a p value <0.25 in Univariate analysis were included then stepwise elimination employed according to confounding and interaction factors.

Statistical analysis was performed on SAS 9.1.3© (USA).

RESULTS.

A total of 118 patients who fulfilled the inclusion criteria were studied between November 2000 and January 2007. The end-point date was 19/03/2009. The median follow-up was 1.426 days (3.9 years) with 26.3 (2.2 years) to 100.2 months (8.3 years) as a range. Clinical characteristics of patients are given in **Table II**, and were in agreement with epidemiological data in advanced colorectal cancer: the median age was 65 with 35 and 81 years old as a range, 78% of patients had good performance status lower than 2 and the sex ratio was 1.45 for male. The metastasis site was unique in 68.6% of cases at enrollment of study with liver metastasis in 82% among them. ACE was superior to normal level (> 3 UI/mL) in 70.3% (83 patients). Tumor's histologies were lieberkuhnian adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma in 89% and 11% respectively.

All patients were treated in first-line therapy (strict inclusion criteria). **Table III** lists the successive treatments from second to fourth line that patients received in order to evaluate the pertinence of the analysis of overall survival. Logically number of treated patients decreased with number of realized lines with respectively 83.9%, 40.7% and 15.3% in second, third and fourth line. About 51% of global population received mainly FOLFIRI regimen in second line. 52.5% received one or several targeted therapies (especially cetuximab and/or bevacizumab) in metastatic treatment setting. FOLFOX-4 has been reused in third or fourth line when it was possible – i.e. after oxaliplatin-neuropathy resolution- in 11% of patients. Finally 24.6% of patients have been too treated by only 5-FU based regimen either by intra-venous way, or per os.

Table IV lists the distribution of studied gene polymorphisms. This distribution was similar with data previously described in the Caucasian population for TYMS, DPYD and MTHFR (**28-33; 56-60**): 21.2% for 2R/2R, 8.5% for MTHFR 1298C/C, 15.2% for MTHFR 677T/T, and 3.4% for DPYD polymorphism heterozygotes (i.e. two A/T for DPYD2846 A>T, and two T/A for 464T>A). All genotypes are in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium and observed frequencies in Caucasians described in previous studies for ERCC1, AGXT and GSTP (**51-53, 61-63**). In summary, the analysis of the polymorphism located at ERCC1 codon 118 (AAC) showed that 16.1% and 37.3% were homozygous for C/C and T/T respectively, and that 46.6% were heterozygous C/T. For GSTP1 Ala114Val (341C>T), 99 patients (83.9%) were wild homozygous (C/C). Finally populations with different

polymorphisms were homogeneous (i.e. without statistical difference between them) with respect to as well as age, performance, histologic type, ACE status, as gender. Such homogenous populations have allowed to realize Uni- and Multivariate analysis in avoiding bias linked to these well-known parameters in advanced colorectal cancer and in focusing on only genetic parameters.

Study of correlation between polymorphisms and toxicities.

The different types of toxicity are described in **Table V**: 386 adverse events (79.8% grade 1-2 side-effects) were reported, especially asthenia (17.4%) with a majority of grade 1 or 2 events, and hematologic events: neutropenia (11.1%) with 9.3% (36) grade 3-4 events, thrombocytopenia (9.0%) with one grade 4 event, and anemia (10.4%) but with only one grade 3 and no grade 4. G-CSF adjunction has to be necessary in 21.2%. 7% of patients suffered from grade 1-2 nausea, under setron-based antiemetic drugs. No case of cardiac toxicity was noticed. After previous detection of DPD SNPs (four patients) and under pharmacokinetic follow-up, severe specific 5-FU side-effects were rare with only three grade 3 mucositis resolved by symptomatic treatment, and no grade 3-4 Hand-Foot syndrome or diarrheas.

Considering oxaliplatin induced neurotoxicity, 27.7% of global side-effects (but 90.6% notified in patients) with 29 grade 3 events were reported (i.e. 27.1% of total neuropathies). Oxaliplatin had to be decreased by 20% in 30% of patients during treatment setting and FOLFOX-4 Regimen stopped for severe toxicity in 59 (50%) of cases: among these, 34 (57.6%) for neurotoxicity, 22 (37.3%) for hematologic side-effects (especially thrombocytopenia), 1 for both (1.7%) and 2 (3.4%) for allergic reaction.

In Univariate logistic regression model for association of germinal polymorphisms and neurotoxicity at least grade 2, two wild variants were significantly observed as potential predictive protective biomarkers: C/C for ERCC1 118C>T and 2R/2R for TYMS, with $p=.02$ and $p=.04$ respectively. ERCC1 genotype remains statistically significant in Multivariate analysis with a higher risk (OR 2.86) for C/T heterozygote group ($p=.013$; CI95% 0.86 to 9.55) (**Table VI**).

Finally no other statistical correlation has been observed between studied polymorphisms and other type of toxicity, notably hematological side-effects.

Study of correlation between secondary surgery, polymorphisms and responses.

The overall response [ORR] (complete response [CR] plus partial response [PR]) rate) was 77.1% at 3 months and 55.7% at 6, with 2.5% and 20.3% of complete response [CR] respectively (**Table VII**), considering metastasis surgery possibly already carried out at three months. These secondary surgeries were carried out in 37 (31.3%) patients with a median overall survival of 38.2 months *vs* 16.6 for non-operative patients ($p < 0.0001$) (**Figure 1**). Finally tailored FOLFOX-4 showed a consistent efficacy with 88.1% of disease control [DC] ([ORR] plus stable disease [SD] rate) after three months and 77.0% at six. Finally response rates were superior than these described in previously studies using FOLFOX-4 in advanced colorectal cancer (**11-17**). No studied genetic polymorphism was significant in Uni- or Multivariate logistic regression analysis for predicting response to treatment in our study.

Study of correlation between clinical data, polymorphisms and survivals.

The overall survival (OS) rate was 76.7%, 30.6% and 12.5% at 1, 3 and 5 years respectively. The median overall survival time was 23.1 months. Median progression-free survival (PFS) time was 9.3 months. Uni- and Multivariate Cox proportional hazard regression models for association of clinical and genetic variables and overall or progression-free survival are reported in **Tables VIII and VIIIbis**. Logically, secondary surgery led to prolonged disease-free and overall survivals as previously described (**14-17**): $p < .0001$; OR 0.27; CI95% 0.17 to 0.43 and $p < .0001$; OR 0.34; CI95% 0.21 to 0.55 respectively. A performance status superior or equal to 2 was a bad prognosis factor for progression-free survival ($p = .04$; OR 1.59; IC95% 0.87 to 1.96). No difference according age, gender or number of metastatic sites were found. Considering studied genotypes, GSTP1 341C>T homozygous C/C group was correlated with a better median progression-free survival than C/T or T/T group: 9.4 months versus 7.0 respectively ($p = .02$) in Univariate Cox regression model. Concerning TYMS enhancer region (5'UTR) genotypes, PFS and OS for 2R/2R population were statistically shorter than 2R/3R or 3R/3R populations ($p = .013$ and $.015$ respectively). No difference with another genotype was found on survival. In Multivariate Cox analysis - excluding patients with secondary surgery carried out -, 2R/3R and 3R/3R TYMS group appears with a better prognosis for overall and progression-free survivals ($p = .02$; OR 0.59; CI95% 0.36 to 0.94 and $p = .006$; OR 0.52; CI95% 0.32 to 0.83 respectively) in contradiction with previous studies (**25-27**). Interestingly, C/T and T/T for GSTP1 341C>T groups had a significant worst progression-free survival than C/C group ($p = .006$; OR 2.07; CI95% 1.22 to 3.49), and T/T

homozygotes for MTHFR 677C>T a trend to better overall survival ($p=.056$; OR 0.57; CI95% 0.33 to 1.01). Finally according to variants with significantly higher risk of progression, i.e. C/T or T/T group for GSTP1 341C>T and 2R/2R for TYMS, we have combined two populations in 118 studied patients: either with no genotype at higher risk (group 0, 78 patients (66.1%)), either with at least one or more (group 1, 40 patients (33.9%)). Median PFS were 9.6 and 7.1 months respectively and for median OS 25.6 and 18.6 months respectively. Kaplan-Meier curves of these 2 groups are shown in **Figures 2 and 3**. The adverse effect for this genotype at higher risk with shorter PFS was also observed in the multivariate analysis (HR 1.80; 95%CI, 1.20 to 2.70, $p=.004$), and with a trend not statistically significant for OS (HR 1.47; 95%CI, 0.27 to 2.23, $p=.006$).

CONCLUSION.

The aim of the current study was on the one hand to report efficacy and safety of FOLFOX-4 regimen with SNP's DPYD determination then 5-FU dose pharmacokinetic adaptation according to our institute's practice, and on the other hand to perform retrospectively a collateral pharmacogenetic study in order to identify the predictive or prognostic value of germline polymorphisms of candidate genes associated with 5-FU and oxaliplatin metabolism or detoxification pathways. A total of 118 patients were studied in first line (strict inclusion criteria) of treatment for advanced colorectal cancer and a panel of 14 genetic polymorphisms within 6 genes (TYMS, DPYD, MTHFR, ERCC1, GSTP1 and AGXT) analyzed for potential statistical correlation.

Concerning efficacy and safety of tailored (i.e. after pre-therapeutic DPYD genotyping followed by 5-FU monitoring) FOLFOX-4 regimen, we reported excellent results in comparison with previous clinical data (2-4) but in correlation with our experience about 5-FU pharmacokinetic adaptation (35, 54-55): overall response rates [ORR] were 77.1% at three months and 53.4% at six, with a disease control still notified 77% at six months. The median overall and progression-free survival times were 23.1 and 9.3 months respectively. Secondary metastasis surgeries were carried out in 37 (31.3%) patients with a median overall survival of 38.2 months. Moreover this adapted treatment was tolerated well with rare grade 3-4 specific 5-FU adverse events (only three grade 3 mucositis). 20.2% severe grade 3-4 toxic side-effects were notified especially neuro- and hematological toxicity mainly linked to oxaliplatin that remains the dose-limiting drug in a such regimen treatment: G-CSF adjunction had to be necessary in 21.2% and oxaliplatin decreased by 20% in 30% of patients during treatment setting. Finally tailored FOLFOX-4 regimen stopped for severe toxicity in 50% along six months and in half for neurotoxicity graded 2 or plus.

It is interesting to note that a such tailored treatment allowed to define a treatment schedule with as well an optimal efficacy – superior than that described results in previous studies -, as a limited toxicity for 5-FU. Considering this, tailored FOLFOX-4 regimen should to be generalized, alone or in combination with newer targeted therapies. Alone because a such spectacular efficacy with a chemotherapy regimen, “ old ” but pharmacokinetically improved, could lead to a very interesting potential alternative option in sequential therapeutics, for example in case of targeted therapies not recommended (bleeding, hypertension for bevacizumab; anaphylactic reaction for cetuximab or mutated Kras), in elder, in unresectable

mCRC, and finally in considering cost-efficiency and rational in use of newer but expensive drugs whether the main aim of treatment is symptoms and disease control in case of refractory advanced colorectal cancer. In this last, for example, two randomised studies that recently compared first-line 5-FU plus folinic acid therapy to the same drugs plus irinotecan, found no difference in terms of progression-free survival after the second line and overall survival (**64-65**). OPTIMOX trials based on potential interest of a therapeutic break after FOLFOX-4 or -6 in first line were in the same way of treatment strategy (**66**).

Tailored FOLFOX-4 regimen should to be as well as generalized in combination with recent targeted therapies. Indeed, even if we must consider our results with caution on account of retrospective design and the small number of patients, ORR and progression-free survival were very similar - and at the very least with lower cost and toxicity - than that observed in large prospective trials including new targeted agents as cetuximab (**67**), or bevacizumab (**68**), as reported in a very recent review (**69**). So we assume FOLFOX-4 with 5-FU pharmacokinetic modulation and combined with such targeted therapies could be an optimal chemotherapy treatment in first-line , and especially to enable a subgroup of patients with hepatic or pulmonary metastases to undergo secondary surgery with a potential cure. This concept is presently under investigation in our institution considering adapted continuous infusion of 5-FU and intensification of irinotecan (CPT11) in according to UGT1A1*28 status, i.e. an “intensive FOLFIRI regimen”.

A growing evidence is that genetic polymorphisms are one of the major causes of individual responses to drugs associated with sometimes severe adverse effects (**18-20**). The present study analyzed both 5-FU metabolism pathway, DNA repair, oxalate and detoxification metabolisms constitutional polymorphisms in order to target the future optimal treatment by defining biomarkers linked to toxicities, responses and survivals: 12 different single nucleotide polymorphisms (except TYMS 5'UTR) in 6 different genes were assessed by pyrosequencing. Considering oxaliplatin-neurotoxicity, one wild genetic variant was significantly observed as potential predictive protective biomarkers as well in Uni- as Multivariate logistic regression models: C/C for ERCC1 118C>T with $p=.02$ and $p=.013$ (CI95% 0.86 to 9.55) respectively. To the best of our knowledge, this is the first study reporting such observational results. ERCC1 118C>T product is a major component of the NER system involving in the repair of oxaliplatin-induced DNA damage (**49-50**), and its

enzymatic ability could be altered by a SNP converting a codon of common usage (AAC) to a less used codon (AAT) with a decrease protein level consequently. Several contradictory clinical studies showed a possible correlation between ERCC1 118C>T and clinical outcome (51-53, 57-59) but never with neurotoxicity linked to oxaliplatin. Moreover AGXT154C>T (Pro11Leu) or GSTP1 313A>G (Ile105Val) were not statistically linked in our study with neurotoxicity as previously described (41, 43), however all patients in our study received Ca and Mg infusions before and after oxaliplatin perfusions, which that could represent a bias by interfering with oxalate pathway. Considering this caution, genesis of neurotoxicity could not be linked – or only partially - to oxalate metabolism and detoxification pathway (especially via GSTP1), but we do the assumption that the main mechanism involved in neurotoxicity could be a default of repair after oxaliplatin exposition in glial structures of neurons especially in the dorsal root ganglia and peripheral nerves. Further *in vitro* and *in vivo* plus clinical studies must to be investigated to confirm this hypothesis.

Concerning correlation between germline polymorphisms of our 13 candidate polymorphisms and clinical outcome in advanced colorectal cancer under tailored FOLFOX-4 regimen, GSTP1 341C>T (Ala114Val) appears to be a good prognostic biomarker for progression-free survival and could be considered in order to optimize based oxaliplatin regimens. Indeed GSTP1 341C>T homozygous C/C group was correlated with a better median progression-free survival than C/T or T/T group: 9.4 months versus 7.0 respectively (p=.02). One explanation could be a higher risk for oxaliplatin induced neurotoxicity in C/T and T/T genotype groups by intracellular drug accumulation, with consequently a compromising patient benefit because of chemotherapy discontinuation. This hypothesis was not confirmed by univariate logistic regression (Table VI) for neurotoxicity, potentially linked to the small number of patients in our study. However, the observed fact that ERCC1 118C>T C/T and T/T genotypes were at risk for a shorter progression-free disease with a trend to statistical significativity (p=.068) (Table VIII), supports our hypothesis.

Strangely and in contradiction with meta-analysis from *Popat et al* (27), in Multivariate Cox regression model, PFS and OS for 5'UTR TYMS 2R/2R population were statistically shorter than 2R/3R or 3R/3R populations (p=.006 and .029 respectively). However the clinical influence of TYMS polymorphisms in 5-FU based chemotherapy are often controversial because of the diversity of used treatments, clinical settings, complex mechanisms of TYMS regulation and mainly because of TYMS tumoral status is probably very different than that analysed in peripheral leucocyte germline (especially via an overexpression, lack of

heterozygosity of chromosome 18, and accumulating genetic changes). In addition, we demonstrated in another article - under press - that the addition of another cytotoxic drug, with another metabolism pathway and another action mode, cancels out the relevance of TYMS status as prognostic or resistance factor. For all these reasons, TYMS genotyping, at least in germline cells, appears to us as a probably bad predictive biomarker for responses or survivals under 5-FU regimen, although an adverse effect on PFS was statistically observed ($p=.0039$), and a “higher” risk population discriminated combining TYMS 2R/2R and C/T or T/T genotypes for GSTP1 341C>T (**Figure 2**). Finally, a trend to better overall survival ($p=.056$; OR 0.57; CI95% 0.33 to 1.01) was observed for T/T homozygotes for MTHFR 677C>T probably via a basal accumulation of intracellular 5,10-methylenetetrahydrofolate which is a cofactor for 5-FU inhibition of TYMS. Indeed MTHFR 677C>T germinal polymorphism leads to a variation in protein enzymatic activity with a decrease by 30% (for heterozygotes) to 75% (for T/T homozygotes), and play a key role in response under 5-FU based treatment as us and others have described (**30-34**). We assume that MTHFR genotypes could be good biomarkers of toxicity and response under 5-FU/leucovorin based treatments. Prospective extended investigations must be done considering as well pharmacological modulation of folinic acid according to germinal status of patients before chemotherapy, and especially during it with dose variation following those of 5-FU and to lead to an optimal TYMS inhibition. This double dose-adjustment will be assessed in a following trial in our institute.

In conclusion, firstly we reported the clinical experience in our institute of first-line tailored FOLFOX-4 following pharmacokinetic monitoring and after pre-therapeutic relevant 5-FU SNPs determination in patients with metastatic colorectal cancer. Specific 5-FU adverse events were rare and efficacy was high with excellent ORR, disease control and survival rates. Secondary metastasis surgery was carried out in 1/3 of patients. We assume that a such treatment schedule should be to consider alone or in combination with targeted therapies, as well as in resectability objective as for symptoms control in global treatment strategy in metastatic colorectal cancer.

Secondly, we identified from a simple and safety blood sample, a germinal polymorphism (C/C for ERCC1 118C>T) linked with subgroups of patients at lower risk of neurotoxicity under oxaliplatin-based chemotherapy. MTHFR and GSTP1 genotypes could be potential

good biomarkers for progression free survival under FOLFOX-4. Further prospective studies must be assessed to confirm these results before implementation in clinical practice. Moreover we assume that TYMS germinal genotype appears to be a bad predictive candidate gene with published data so conflicting, as shown in this current study.

Finally these retrospective results must to be interpreted with caution: it appears difficult to investigate the effects of one or several polymorphisms during all metastatic treatment setting: Many interferences linked to clinical status or to different lines with combination and possibly targeted therapies, can lead statistical confusions. However our present study appears relevant with a homogenous cohort, in early-stage in disease setting (first-line), and with an analysis of genotypes involved in independent biologic pathways.

REFERENCES

1. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate [see comments]. *J Clin Oncol* 1992; 10(6):896-903.
2. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiulo R, Focan C, *et al.* Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 136-147.
3. De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, *et al.* Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947.
4. Douillard J-Y, Cunningham D, Roth A, Navarro M, James RD, Karosek P, *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. *Lancet* 2000; 355: 1041-1047.
5. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MT, *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 906-914.
6. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342.
7. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, *et al.* High-dose bevacizumab improves survival when combined with FOLFOX4 in previously treated advanced colorectal cancer: Results from the eastern Cooperative Oncology group (ECOG) study E3200. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005; 23: 2.
8. Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, *et al.* Bevacizumab (Bev) in combination with XELOX or FOLFOX4: Updated efficacy results from XELOX-1/NO16966, a randomized phase III trial in first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 4028.
9. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345.
10. Van Cutsem E, Nowacki M, Lang I, *et al.* Randomized phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 4000.
11. Tournigand C, Louvet C, Quinaux E, André T, Lledo G, Flesch M, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX versus FOLFOX followed by FOLFIRI in metastatic

colorectal cancer (MCRC): final results of a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 124a.

12. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1209-1214.
13. Simpson D, Dunn C, Curran M, Goa KL. Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2003; 63(19): 2127-2156.
14. Kelly H, Goldberg RM: Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: Current options, current evidence. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4553-4560.
15. Wicherts DA, de Haas RJ, Adam R. Bringing unresectable liver disease to resection with curative intent. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33 (Suppl 2); S42-51.
16. Adam R, Delvart V, Pascal G, *et al.* Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240: 644-657.
17. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9249.
18. Sekine I, Saijo N. Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann Oncol* 2001; 12:1515-1525.
19. Stohlmacher J. Pharmacogenetics in gastro-intestinal tumors. *Onkol* 2005; 28:435-440.
20. Marsh S, and McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *Br J of Cancer* 2004; 90:8-11.
21. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20(3):191-197.
22. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, and Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; 7:4096-4101.
23. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; 63:6004-6007.

24. Mandola MV, Stoehmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, and Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Clin Cancer Res* 2003; 63:2898-2904.
25. Pullarkat ST, Stoehmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1(1):65-70.
26. Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, Francoual M, Formento P, Renee N, Chamorey E, Bourgeon A, Seitz JF, Delpero JR, Letoublon C, Pezt D, Milano G. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002; 20(12):2832-2843.
27. Popat S, Matakidou A, and Houlston R. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(3): 529-536.
28. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, Schneider M, Demard F and Milano G. Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12:2248-2253.
29. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, Martin C, and Sandler R. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and Whites. *Cancer Epidemiology* 2002; 11:1611-1621.
30. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy ? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57:835-840.
31. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:134-144.
32. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, et al. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res* 2003; 9:5860-5865.
33. Iacopetta B. Methyl-group metabolism and the response of colorectal cancer to 5-Fluorouracil. *Crit rev Oncogenesis* 2006; 12:1-12.
34. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A and Gamelin E. Influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2007 August; [Epub ahead of print].

35. Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, Schilf A, Gastiaburu JJ, Brienza S, Itzhaki M, Metzger G, N'Daw D, Vignoud J, Abad A, François E, Gamelin E, Marty M, Sastre J, Seitz JF and Ychou M. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann of Oncol* 1996; 7:95-98.
36. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, William GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004; 9:8-12.
37. Ashley AC, Sargent DJ, Alberts SR, et al. Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX): intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110:670-677.
38. Hochster HS, Grothey A, Childs BH. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4028-4029.
39. Susman E. Xaliproden lessens oxaliplatin-mediated neuropathy. *Lancet Oncol* 2006; 7:288.
40. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1247-1254.
41. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA. Glutathione-S-Transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancr Res* 2006; 12:3050-3056.
42. Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat rev Drug Discov* 2004; 3:11-12.
43. Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Le Bouil A, Simard G, Boisdrion-Celle M, and Gamelin E. Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res* 2007; 13(21):6359-6368.
44. Oxaliplatin neurotoxicity – no general ion channel surface-charge effect. Broomand O, Jerremalm E, Yachnin J, Ehrsson H and Elinder F. *J of Neg Results in BioMed* 2009; 8:2-8.
45. Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:307-320.
46. Siddick ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265-7279.
47. Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X and Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 2002; 38:1405-1412.
48. Cobo M, Isla D, Massuti B, *et al.* Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:2747-2754.

49. Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair: II. From yeast to mammals. *Trends Genet* 1993; 9:211-217.
50. Bergstralh DT, Sekelsky J. Interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? *Trends Genet*. 2008 Feb; 24(2):70-6. Epub 2008 Jan 14. Review.
51. Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin JC, Ducreux M, Sarasin A and Praz F. ERCC1 Codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-Fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17): 6212-6217.
52. Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, Sones E, Mallik N, Lenz HJ. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3):162-166.
53. Chang PM, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Wang WS. ERCC1 codon 118 C>T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2008 [Epub ahead of print].
54. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Delva R, Regimbeau C, Cailleux PE, Alleaume C, Maillet ML, Goudier MJ, Sire M, Person-Joly MC, Maigre M, Maillart P, Fety R, Burtin P, Lortholary A, Dumesnil Y, Picon L, Geslin J, Gesta P, Danquechin-Dorval E, Larra F, Robert J. Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 1998; 16(4):1470-1478.
55. Morel A., Boisdron-Celle M., Fey L., Lainé-Cessac P., Gamelin E. Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with lethal outcome after 5-fluorouracil administration and determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clin Biochem* 2007; 40: 11-17.
56. Marsh S, Collie-Duguid E, Li T, Liu X, and McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and asian populations. *Genomics* 1999; 58:310-312.
57. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, Schneider M, Demard F and Milano G. Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12:2248-2253.
58. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1611-1615.

59. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 1-8.
60. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1(1):65-70.
61. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, Di Marsico R, Antonuzzo A, Orlandini C, Ricciardi S, DelTacca M, Peters GJ, Falcone A, and Danesi R. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(6):1797-1803.
62. Keam B, Im SA, Han SW, Ham HS, Kim MA, Oh DY, Lee SH, Kim JH, Kim DW, Kim TY, Heo DS, Kim WH, and Bang YJ. Modified FOLFOX-6 chemotherapy in advanced gastric cancer: results of phase II study and comprehensive analysis of polymorphisms as a predictive and prognostic marker.
63. Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, Jaeger E, Bokemeyer C, Ehniger G, and Stoehlmacher J. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2009 [ahead of print].
64. Seymour MT. Fluorouracil, oxaliplatin and CPT11 use and sequencing (MRC FOCUS): a 2135-patient randomized trial in advanced colorectal cancer. The UK NCRI Colorectal Clinical Studies Group. *J Clin Oncol* 2005; 23(suppl 16S): 250S (abstract 3518).
65. Bouché O, Castaing M, Etienne PL. Randomized strategical trial of chemotherapy in metastatic colorectal cancer (FFCD 2000-05): Preliminary results. *Am Soc Clin Oncol* 2007, 180S (Abstract 4069).
66. Tournigand C, Cervantes A, Figuer A, Lledo G, Flesch M, Buyse M, Mineur L, Carola E, Etienne PL, Rivera F, Chirivella I, Perez-Staub N, Louvet C, André T, Tabah-Fisch I, de Gramont A. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-Go fashion in advanced colorectal cancer--a GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2006; 24(32):5176-7; author reply 5177. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20; 25(24):3572-5.
67. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Raud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zube A, and Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(5): 663-671.
68. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, Kretschmar A, Michael M, Dibartolomeo M, Mazier MA, Canon JL, Georgoulas V, Peeters M, Bridgewater J, Cunningham D; on

behalf of the First BEAT investigators. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol.* 2009 Apr 30. [Epub ahead of print].

69. Okines A, Cunningham D. Current perspective: Bevacizumab in colorectal cancer-time for reappraisal? *Eur J Cancer.* 2009 Jul 28 [Epub ahead of print].

TABLES

Table I. Characteristics of the studied polymorphisms with primer sequences

Gene (Site)	Primer sequences 5' → 3'	Anneling Tm (°C)
Ala226Val (677C>T)	(up) TATTGGCAGGTTACCCCAA	57.0
	(down) Biot CTCACCTGGATGGGAAAGAT	
	(seq) AGAAGGTGTCTGCGG	
MTHFR 1298A>C	(up) GCCAGGGGCAATTCCTCTT	57.0
	(down) Biot CTTTGTGACCATTCCGGTTT	
	(seq) GGAGCTGACCAGTGAAG	
GSTP1 Ile105Val (313A>G)	(up) GGACCTCCGCTGCAAATAC	56.0
	(down) Biot GGCACACAAGAAGCCCCTTT	
	(seq) ACCTCCGCTGCAAAT	
GSTP1 Ala114Val (341C>T)	(up) GGATGATACATGGTGGTGTCTG	56.0
	(down) Biot GGACAGCAGGGTCTCAAAG	
	(seq) GTGTCTGGCAGGAGG	
ERCCI Asn118Asn (118C>T)	(up) TGTGGTTATCAAGGGTCATCC	58.0
	(down) Biot CCAGCACATAGTCGGGAATTA	
	(seq) ACTGAAGTTCGTGCG	
ERCCI 3'UTR (8092C>A)	(up) CCGGGGGCAGACTACACA	58.0
	(down) Biot AGAGACAGTGCCCAAGAGG	
	(seq) GGACAAGAAGCGGAA	

Table I (bis). Characteristics of the studied polymorphisms with primer sequences.

Gene (Site)	Primer sequences 5' → 3'	Anneling Tm (°C)
IVS14+1G>A	(up) ATCAGTGAGAAAACGGCTGC	58.0
	(down) Biot TAAACATTCACCAACTTATGCCA	
	(seq) AGGCTGACTTTCCAGA	
DPYD 464T>A	(up) TTATGGAGCTGCTAAGATGA	58.0
	(down) Biot ATCATAACATCCTCAGTAGCAAA	
	(seq) CCCATTAATATTGGT	
DPYD 1679T>G	(up) AATATGGAGCTTCCGTTTCT	58.0
	(down) Biot GAGAGAAAGTTTTGGTGAGG	
	(seq) CCAGCCACCAGCACATCAA	
DPYD 2846A>T	(up) AAGCACTGCAGTACCTTGGA	58.0
	(down) Biot TCATGTAGCATTTACCACAGTTGA	
	(seq) GCAAGTTGTGGCTATGA	
AGXT Pro11Leu (154C>T)	(up) CACCAATCCTCACCTCTCAC	58.0
	(down) Biot TCCTTGCTCATGGACCCG	
	(seq) AL +TGC+TGG+TGACCC	
AGXT Ile340Met (1142A>G)	(up) TCTCACCCACGCACTGAG	58.0
	(down) Biot GTTTGGTTTCTGCAAAAGG	
	(seq)CATCGTCAGCTACGTCA	
TYMS 5'UTR	(up) GTCCTGCCACCGCGCCACTT	55.0
	(down) GAGCCGGCCACAGGCATGG	

Table II. Patients and tumor' initial characteristics.

Clinical data		Number (%)
Gender	Male	70 (59.3)
	Female	48 (40.7)
PS	0-1	92 (78.0)
	2-3	26 (22.0)
Median age (years)		65.0
Range (years)		35-81
Tumor histology	Lieberkuhnian	105 (89.0)
	Mucinous	13 (11.0)
Initial ACE levels	Normal	35 (29.7)
	> 3 UI/mL	83 (70.3)
Tumor site	Colon	77 (65.3)
	Rectum	41 (34.7)
<hr/>		
Metastatic site		
Number of sites	= 1	81 (68.6)
	= 2	30 (25.4)
	≥ 3	7 (6.0)
Synchronous Metastasis		109 (92.4)
If unique site: Location	Liver	66 (81.5)
	Lung	11 (13.6)
Peritoneal Carcinomatosis or nodes		4 (4.9)

Table III. Distribution of the successive lines in the whole population.

	Line 3	Line 4	
Number of treated patients and percentage according to initial population (%)	99 (83.9%)	48 (40.7%)	18 (15.3%)
Type of chemotherapy			(N) Total (%)
FOLFIRI	58	3	0 61 (51.47%)
FOLFOX	0	9	4 13 (11.0%)
Targeted-therapy Regimens	27	29	6 62 (52.5%)
Intra-venous 5-FU (FUFOL or LV5VU2 Regimen)	8	2	4 14 (11.9%)
Per os 5-FU prodrugs (CAPECITABINE)	6	5	4 15 (12.7%)

Table IV. Distribution of studied polymorphisms.

		Nb of patients	Frequency (%)
MTHFR 677C>T	C/C	42	35.6
	C/T	58	49.1
	T/T	18	15.2
MTHFR 1298A>C	A/A	63	53.4
	A/C	45	38.1
	C/C	10	8.5
GSTP1 313 A> G	A/A	55	46.6
	A/G	50	42.4
	G/G	13	5.0
GSTP1 341C>T	C/C	99	83.9
	C/T	17	14.4
	T/T	2	1.7
ERCC1 118C>T	C/C	19	16.1
	C/T	55	46.6
	T/T	44	37.3
ERCC1 8092C>A	C/C	69	58.5
	C/A	40	33.9
	A/A	9	7.6
DPYD 2846 A>T	A/T	2	1.7
	464 T>A	T/A	2
AGXT 154C>T	C/C	66	56.0
	C/T	47	39.8
	T/T	5	4.2
AGXT 1142A>G	A/A	62	52.5
	A/G	50	42.4
	G/G	6	5.1
TYMS (5'UTR)	2R/2R	25	21.2
Polymorphisms	2R/3R	58	49.1
	3R/3R	35	29.7

Table V. Distribution of the toxic side-effects under tailored FOLFOX-4 regimen.

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total (n)
Neuropathy	56	22	29	0	107
Mucositis	12	2	3	0	17
Conjunctival effects	9	2	0	0	11
Diarrhoea	2	1	0	0	3
Hand-foot syndrome	9	5	0	0	14
Cardiac effects	0	0	0	0	0
Neutropaenia	3	4	31	5	43
Thrombopaenia	9	22	3	1	35
Anaemia	30	9	1	0	40
Nausea	21	6	0	0	27
Alopecia	18	4	0	0	22
Asthaenia	49	13	5	0	67
Total (n)	218	90	72	6	386

Table VI. Uni- and Multivariate Logistic Regression models for association of genetic variables with oxaliplatin-neurotoxicity grade >2.

Variable	Univariate model		Multivariate model	
	OR [IC _{95%}]	p	OR [IC _{95%}]	p
AGXT		0.5631		
	C/C	1		
	C/T	0.556 [0.087 ; 3.546]		
	T/T	0.414 [0.063 ; 2.721]		
AGXT		0.9205		
	A/A	1		
	A/G	0.722 [0.135 ; 3.867]		
	G/G	0.786 [0.144 ; 4.279]		
ERCC1		0.0236		0.0126
	C/C	1	1	
	C/T	3.952 [1.103 ; 14.164]	2.862 [0.857 ; 9.552]	
	T/T	1.402 [0.359 ; 5.468]	0.671 [0.192 ; 2.340]	
ERCC1		0.3553		
	A/A	1		
	A/C	0.370 [0.081 ; 1.692]		
	C/C	0.341 [0.079 ; 1.480]		
GSTP1		0.1638		
	C/C	1		
	C/T + T/T	2.028 [0.750 ; 5.487]		
GSTP1		0.0725		0.1187
	A/A	1	1	
	A/G	2.469 [1.037 ; 5.882]	2.290 [0.906 ; 5.788]	
	G/G	2.964 [0.782 ; 11.232]	3.248 [0.751 ; 14.049]	
MTHFR		0.2974		
	C/C	1		
	C/T	0.597 [0.268 ; 1.332]		
	T/T	0.455 [0.144 ; 1.438]		
MTHFR		0.9181		
	A/A	1		
	A/C	0.703 [0.185 ; 2.676]		
	C/C	0.800 [0.203 ; 3.155]		
TYMS		0.0450		0.0658
	2R	1	1	
	2R/3R	2.399 [0.836 ; 6.888]	3.525 [1.053 ; 11.805]	
	3R	4.222 [1.356 ; 13.150]	5.638 [1.585 ; 20.060]	

Table VII. Objective response rates.

	Nb of patients (%)	Nb of patients (%)
	at 3 months	at 6 months
Complete Response (CR)	3 (2.5)	23 (20.3)
Partial Response (PR)	88 (74.5)	40 (35.4)
Overall Response (OR)	91 (77.1)	63 (55.7)
= CR + PR		
Disease Control	104 (88.1)	87 (77.0)
Disease Progression	14 (11.9)	26 (23.0)

NB: At 6 months, 5 patients were dead.

Table VIII. Univariate Cox Proportional Hazard Regression models for association of clinical and genetic variables with Survivals.

Univariate	Overall Survival		Progression-free Survival	
	OR [IC 95%]	P	OR [IC 95%]	p
Age	≤60 years	1	1	0.8636
	>60-≤70 years	0.893 [0.547; 1.458]	0.894 [0.568; 1.405]	
	>70 years	1.102 [0.676; 1.794]	0.994 [0.628; 1.573]	
Gender	Man	1	1	0.1876
	Woman	1.630 [1.078; 2.465]	1.292 [0.883; 1.891]	
Number of metastatic sites	≤1	1	1	0.2064
	>1	1.183 [0.760; 1.840]	1.301 [0.865; 1.958]	
Performance status	0-1	1	1	0.0459
	2-3	1.433 [0.888; 2.311]	1.588 [0.865; 1.958]	
Resecability	No	1	1	<0.0001
	Yes	0.345 [0.214; 0.556]	0.267 [0.166; 0.430]	
AGXT*		1	1	0.8115
	C/C	1.230 [0.809; 1.869]	0.895 [0.606; 1.323]	
	C/T T/T	1.570 [0.569; 4.370]	0.818 [0.325; 2.057]	
AGXT1*		1	1	0.3308
	A/A	1.096 [0.724; 1.659]	0.921 [0.627; 1.353]	
	A/G G/G	0.846 [0.305; 2.352]	0.492 [0.192; 1.260]	
ERCC1*		1	1	0.1139
	C/C	1.146 [0.638; 2.059]	1.298 [0.758; 2.224]	
	C/T T/T	0.901 [0.490; 1.656]	0.837 [0.480; 1.460]	
ERCC1*		1	1	0.0684
	C/C + C/T T/T	0.815 [0.535; 1.240]	0.695 [0.470; 1.028]	
ERCC1*		1	1	0.9866
	A/A	0.804 [0.369; 1.751]	1.046 [0.504; 2.170]	
	A/C C/C	0.835 [0.396; 1.759]	1.014 [0.503; 2.045]	
GSTP1-		1	1	0.0997
	C/C	1.076 [0.618; 1.873]	1.727 [1.018; 2.929]	
	C/T T/T	1.825 [0.445; 7.484]	1.829 [0.453; 7.625]	
GSTP1-		1	1	0.0320
	C/C C/T + T/T	1.130 [0.667; 1.917]	1.740 [1.049; 2.886]	
GSTP1*		1	1	0.5342
	A/A	0.937 [0.607; 1.447]	1.046 [0.703; 1.556]	
	A/G G/G	1.128 [0.580; 2.192]	1.421 [0.765; 2.638]	
MTHFR*		1	1	0.2109
	C/C	1.133 [0.724; 1.774]	1.193 [0.790; 1.799]	
	C/T T/T	0.587 [0.313; 1.101]	0.732 [0.414; 1.296]	
MTHFR*		1	1	0.1240
	C/C + C/T T/T	0.545 [0.310; 0.959]	0.665 [0.395; 1.119]	
MTHFR*		1	1	0.2554
	A/A	1.192 [0.774; 1.835]	1.236 [0.831; 1.838]	
	A/C C/C	0.929 [0.440; 1.960]	0.698 [0.345; 1.412]	
TS*	2R	1	1	0.0136
	2R/3R	0.476 [0.284; 0.796]	0.485 [0.295; 0.797]	
	3R	0.728 [0.420; 1.265]	0.706 [0.417; 1.195]	
TS	2R	1	1	0.0153
	2R/3R + 3R	0.557 [0.347; 0.894]	0.559 [0.352; 0.887]	

+ Proportional risk was not respected for overall survival; * Proportional risk was not respected for progression free survival

Table VIIIbis. Multivariate Cox Proportional Hazard Regression models for association of genetic variables with Survivals.

Univariate		Overall Survival		Progression-free Survival	
		OR [IC 95%]	p	OR [IC 95%]	p
MTHFR	CC+CT	1	0,0560	1	0,0871
	TT	0,575 [0,326 ; 1,014]		0,631 [0,373 ; 1,069]	
TYMS	2R	1	0,0287	1	0,0063
	2R/3R + 3R	0,588 [0,365 ; 0,946]		0,520 [0,325 ; 0,831]	
GSTP1	CC			1	0,0064
	CT+TT			2,070 [1,227 ; 3,494]	

FIGURES

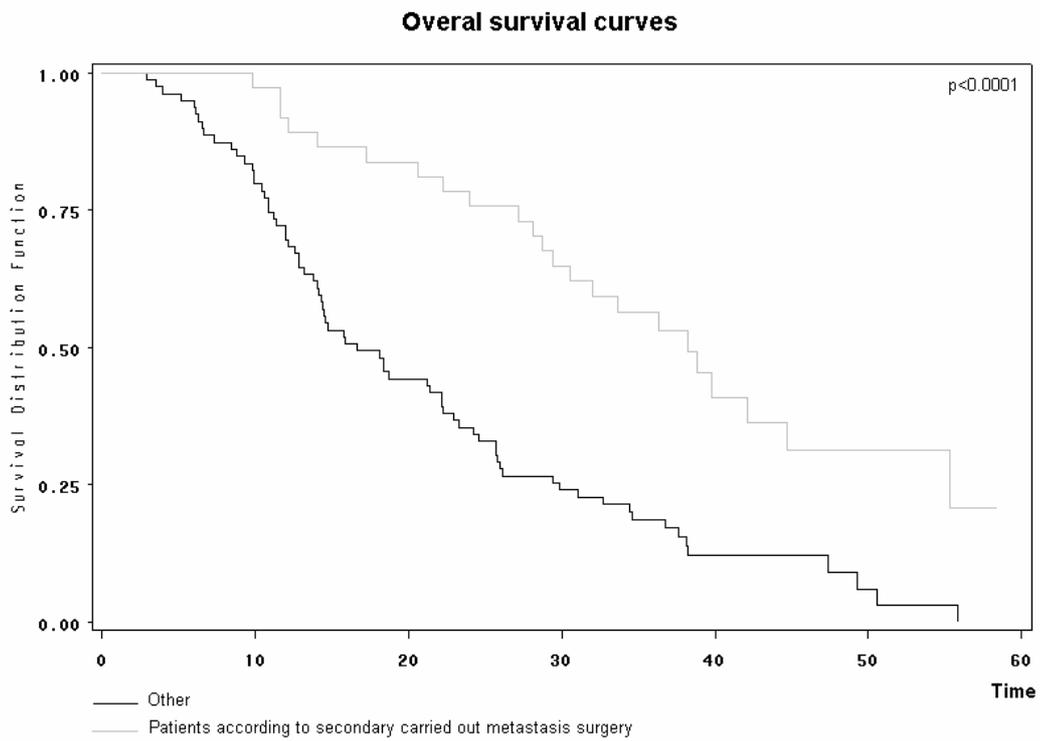


Figure 1. Univariate Cox regression model for overall survival of patients according to secondary carried out metastasis surgery.

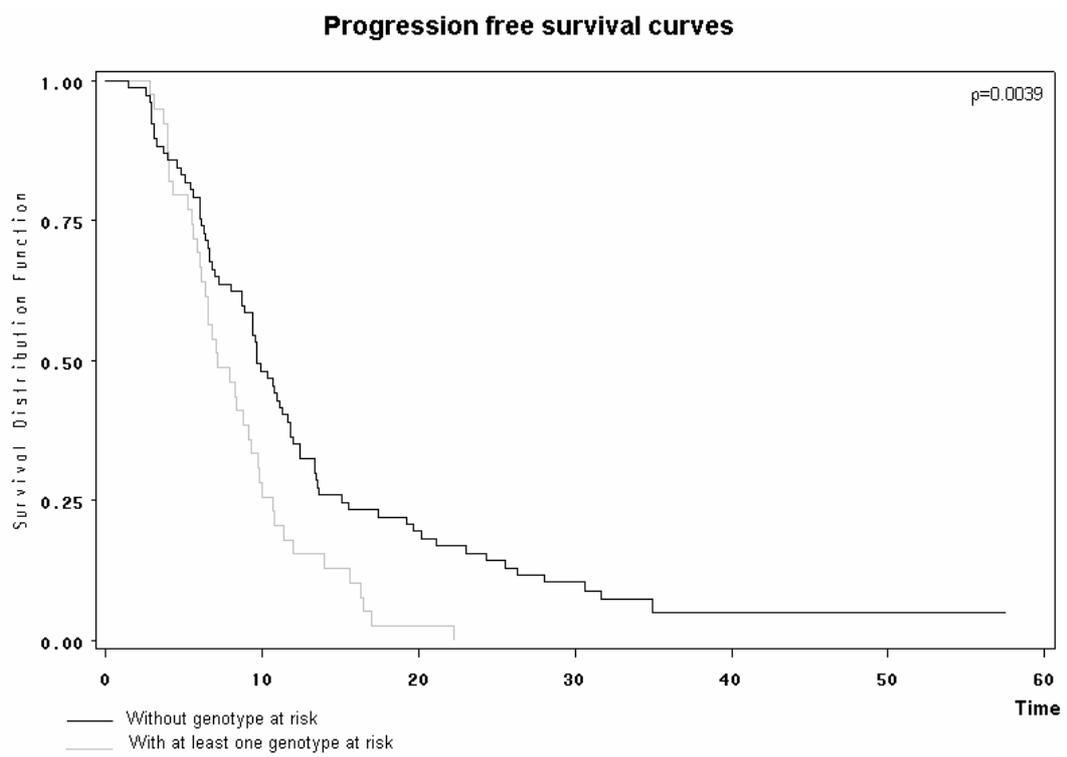


Figure 2. Progression-free survival curves of patients without (group 0 in bold) or with at least one genotype at risk (group 1).

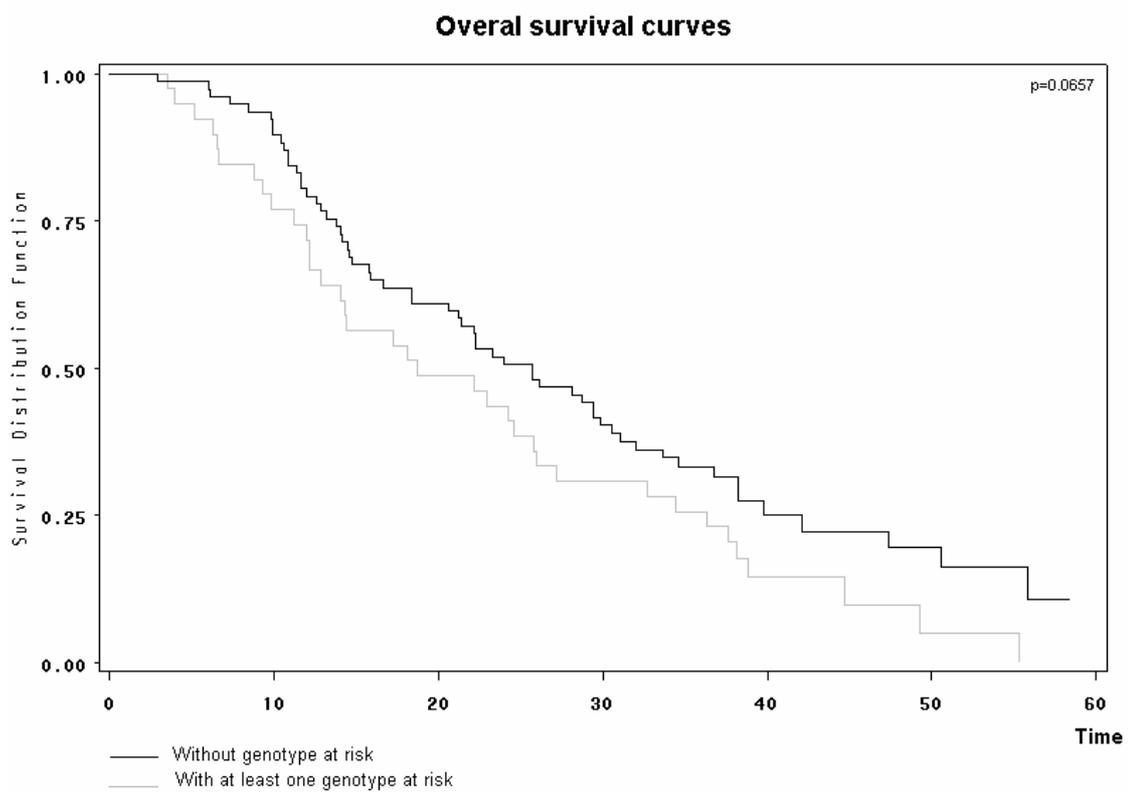


Figure 3. Overall survival curves of patients without (group 0 in bold) or with at least one genotype at risk.

Publication N° 4

A MULTIVARIATE ANALYSIS OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER AND TREATED WITH FIRST-LINE FOLFOX4 CHEMOTHERAPY.

Capitain, O.^{1,2}, Asevoaia, A.¹, Poirier A.L.³, Boisdron-Celle, M.¹, Morel, A.¹, Gamelin, E.^{1,2}.

¹Laboratory of Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U564

²Department of Medical Oncology and Clinical Pharmacology,

³Department of Statistics and Data Management

**Centre Paul Papin, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer
49933 Angers Cedex, France.**

Running Title:

Corresponding author: Andreea Asevoaia

Address: Centre Paul Papin

Dept. of Clinical Pharmacology

INSERM U892

49033 Angers Cedex

France

Telephone: +33 241 352700

Fax: +33 241 352722

E-mail: a_asevoaia@yahoo.com

Text: xx pages

Tables: 7

Figures: 1

References: 58

Appendices: 0

Abstract: 157 words

Abbreviations: Fluorouracil (FU); Oxaliplatin (LOHP); single-nucleotide polymorphism (SNP); Xeroderma Pigmentosum Group A, B and D (XPA, XPB, XPD); Excision Repair Cross-Complementing group 1 (ERCC1); X-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1).

ABSTRACT

Oxaliplatin damages the DNA, leading to apoptosis. XPA, XPD, XPB, ERCC1 and XRCC1 genes are involved in DNA repair, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes can influence the efficacy of Oxaliplatin. In this retrospective study, we analyzed 6 somatic functional genomic polymorphisms within 5 genes involved in DNA repair and correlated the results with toxicities, time to progression (TTP), overall survival and response to Oxaliplatin in 118 advanced colorectal cancer patients (CRC) treated with 5-Fluorouracil regimen combined with Oxaliplatin (tailored FOLFOX-4) as first-line treatment.

The pyrosequencing assay was used to analyze the genetic variants for XPA (5'UTR A/G), XPB (K117R A/G), XPD (Lys751Gln), ERCC1 (3'UTR C/A and Asn118Asn) and XRCC1 (Arg399Gln).

Considering ERCC1 AND XPD polymorphisms, the risk of Oxaliplatin-linked neurotoxicity was statistically higher for the wild genetic variant groups. XRCC1 Arg399Gln (C>T) appears to be good prognosis biomarkers for overall and progression-free survivals and must be considered in order to optimize based 5-FU regimens.

Keywords: Oxaliplatin; polymorphism; pharmacogenetics

INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most frequent malignancies in industrialized countries for both men and women. In adjuvant or metastatic settings, the combination of 5-fluorouracil (5-FU) and folinic acid has been, for a long time, the standard treatment. The clinical response rate ranged from 10% to 20% when 5-FU is administered as a single agent (1-4). Adjusting the dose or changing the protocol of administration enhances the therapeutic effects of this drug. In the last decade a significant increasing to 50% for objective response, with a better outcome, were obtained when 5-FU based regimens were associated with other synergic cytotoxic agents like oxaliplatin and irinotecan (5-8). The introduction of these cytotoxic agents into the chemotherapy treatment of metastatic colorectal cancer represents thus an important step in fighting this disease.

FOLFOX-4 regimen, which includes bolus/infusional 5-fluorouracil with folinic acid modulation and oxaliplatin, has become the most commonly used treatment in the first line for patients with metastatic colorectal cancer (9-11). Despite that, chemotherapy regimens involve several toxic side effects with potentially unacceptable life-threatening events. Moreover there is still a considerable individual variation in the response to these drugs. Although synergistic effects of 5-FU and oxaliplatin have increased response rates up to 25% even in heavily pretreated relapsing patients, the mechanisms for resistance still remain unknown (12). At the present time, the detection of patients either responder or with a high risk of toxicity remains unclear, but the identification of predictive markers for clinical outcome may help to define prospectively those who are more likely to benefit from the treatment (13-15).

Oxaliplatin (Eloxatin; *trans-l*-diaminocyclohexane oxalatoplatinum, L-OHP) is the only platinum compound to show clinical activity in colorectal cancer. The cytotoxic action of this drug is manifested by the formation of mono-adducts of platinum between two adjacent guanines or, more rarely, between a guanine and adenine, secondarily converted into di-adducts (16-19). If not eliminated, the oxaliplatin adducts are lethal for the cell. Its main adverse side effects are hematologic toxicity (especially neutro- and thrombopenia) often manageable and a peripheral sensory neuropathy (3; 5; 9-11; 20).

The neurotoxicity, acute or chronic, induced by oxaliplatin is linked to potential severe effects on quality of life. Its incidence was estimated to more 70% of the patients receiving oxaliplatin (21) and so is dose-limiting for use of this drug in long-term. Moreover this

adverse side effect can compromise patient benefit because of chemotherapy discontinuation (22).

Likewise, resistance to oxaliplatin is a multifactor process (23-25). Several mechanisms are responsible for reduced sensitivity to this drug like a decrease in intracellular drug accumulation or, an increase of the intracellular detoxification's molecule, but also an increase in the repair of DNA adducts by NER (*Nucleotide Excision Repair*) and BER (*Base Excision Repair*) pathways. A large body of evidence attribute the repair of platinum-DNA adducts in cellular DNA to the NER pathway. Therefore, the nucleotide excision repair pathway may have particular importance for resistance to this drug.

This system involves four steps and the action of several actors. After the recognition of damaged DNA, the heterodimeric complex XPC-hHR23B recruit different repair factors forming complex bound proteins. The damaged single-strand fragment (usually 27-30 bp) is separated from the intact strand by helicases XPB and XPD (*Xeroderma Pigmentosum Complementation group B and D*), and then removed by endonucleases XPG (*Xeroderma Pigmentosum Complementation group G*) and XPF-ERCC1 heterodimeric protein complex (26). Finally, the synthesis is made by the DNA polymerases (27-28).

A various number of functional polymorphisms that could influence DNA repair capacity and thus the efficacy of 5-FU and oxaliplatin were identified inside the DNA repair genes. However, association studies with outcome seem to be regimen and cancer type specific.

ERCC1 protein (*Excision Repair Cross Complementing*) plays an important role in the nucleotide excision repair (NER) pathway. He forms with XPF (*Xeroderma pigmentosum group F*) a protein complex that catalyses incision on 5'-side of the lesion (29).

Numerous studies have shown a correlation between ERCC1 polymorphisms (especially N118N) and clinical endpoints in colorectal cancers, sometimes with contradictory results (30-32). The XPD protein is another key member of the NER pathway leading to repair structural lesions such as bulky adducts and thymidine dimers (33). The XPD encodes a helicase that is an essential component of the transcription factor called TFIIH (34). Mutations of XPD gene could enhance or decrease the activity of TFIIH complexes increasing the likelihood of oxaliplatin resistance or, in contrary, repair and transcription defects respectively (35). Several teams have shown the role of K751Q and D312N polymorphisms as predictors of response to chemotherapy (36-38). Furthermore, in a few translational studies, no significant associations were found between some XPD polymorphisms and clinical outcome or safety under platinum chemotherapy (39). XPA, another member of the NER, interacts with RPA, ERCC1-XPF, but also with TFIIH, thus playing a central role in the

correct positioning of the complex repairs on the damaged DNA **(29)**. Regarding the impact of different XPA polymorphism on patient's clinical outcome, the results are contradictory **(40-41)**.

The XRCC1 gene is involved in the base excision repair (BER) of damages bases caused by oxidative deamination, oxidation and methylation. This gene plays a very important role in the BER performance, since this protein seats the system where the repair must be realized. Several XRCC1 polymorphisms could be cancer risk biomarkers **(42)** as well as oxaliplatin-related toxicities (hematological and gastrointestinal) or clinical outcome predictive markers but further clinical studies must be investigated **(43-44)**.

The goal to this study was to examine in the DNA blood samples a panel of 6 genetic polymorphisms within 5 genes (XRCC1, ERCC1, XPA, XPB and XPD) involved in DNA repair by NER and BER pathway. These genes had been chosen based on previously studies in order to determinate genetic candidate biomarkers by analyzing potential statistically correlation between them and clinical outcome in advanced refractory colorectal patients treated by combination pharmacokinetic adapted 5-FU/Leucovorin with oxaliplatin chemotherapy (tailored FOLFOX-4).

PATIENTS AND METHODS

Patients

118 adult patients were included in this retrospective analysis, between November 2000 and January 2007. The end-point date was 03/19/2009. All subjects have an advanced colorectal cancer and they received a FOLFOX-4 regimen, including 5-FU, leucovorin and oxaliplatin. To be eligible for inclusion in the study, the patient had to be at least 19 years old, present measurable metastatic lesions, and have an estimated life expectancy of at least 3 months. All patients were required to have normal bone marrow and organ function before the administration of drugs. The performance status was evaluated as defined by the World Health Organization (WHO). All patients signed an informed consent form for blood sample collection to establish the clinical significance of genetic polymorphisms in advanced colorectal cancer. A computed tomography scan was performed prior to treatment, and metastatic lesions were measured.

Chemotherapy regimen description

Oxaliplatin was administered every 2 weeks, before 5-FU treatment, for 2 hours. The initial dose was 85mg/m². Infusions of magnesium and calcium before and after oxaliplatin perfusion were systematically performed for each cure.

5-FU was administered for 46 hours after treatment with 200mg/m² of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m² of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m² and then tailored according to our institute's practice, using pharmacokinetic monitoring as previously described according to fluorouracil plasma concentrations after 43 hours (steady-state concentration) and dose-adjustment charts (45). In cases of DPD relevant SNPs, i.e. 2846A>T, IVS14+1G>A, 1679T>G, 464 T>A, the initial dose was decreased by 50% (46). Treatment was continued until progression was documented, severe toxicity took place, or according to the patient's or doctor's decision.

Follow-Up

Every fortnight, each patient was physically examined and any adverse toxic events were evaluated and graded. Treatment efficacy was evaluated by comparing pretherapeutic metastatic lesion measurements to those remaining after 3 months of treatment, and then every 3 months. Data were collected until the death of the patient or until the termination date

of the study (end-point: 19/03/2009) and any treatment administered after progression under the FOLFOX-4 regimen was recorded.

Response assessment

The response was assessed according to the 'Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group Criteria' and by reviewing computed tomography scans.

Tolerance assessment

All adverse events, especially neuropathy and hematological events were recorded and graded for severity according to NCI-CTC scales. Haemogrammes were performed every 2 weeks; electrolyte tests and tests on urea, creatinine and liver enzymes were carried out every month. In the event of significant grade 2 toxicity for 5-FU - and without pharmacokinetic recommendations for a decrease -, the dose was reduced by 10%. In cases of grade 3 toxicity or grade 2 for specific Oxaliplatin-neuropathy, the treatment was interrupted until toxic manifestations were resolved and treatment was then restarted with a decrease of 25% of 5-FU or Oxaliplatin respectively. Oxaliplatin was stopped if neuropathy grade 3 but 5-FU continued alone (LV5FU2 regimen) in this case. Treatment was stopped in cases of all grades 4 toxicity.

Genotyping

Isolation of patient DNA from blood samples

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the blood DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each sample was controlled with respect to DNA isolation by UV transillumination of ethidium bromide-stained gels from subsequent electrophoretic separation in 1,2% agarose. DNA was isolated from 118 subjects and was used to identify XPA, XPB, XPD, ERCC1 and XRCC1, polymorphisms. For each group, appropriate positive and negative controls of established genotypes were realized.

Analysis of Polymorphisms

Genotyping was performed using DNA obtained from peripheral blood. All polymorphisms were investigated using a polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR reactions contained: 50µl of reaction mix consisted of 1X PCR Buffer (pH 8,5), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (Invitrogen), 10 pmoles of each primer and 0,5 U of Taq DNA Polymerase. All

PCR reagents were from Promega Corporation and PCR primers were from Eurofins MWG Operon. PCR started with initial denaturation (94°C for 2 min 30 sec), ended with final extension (72°C for 5 min) and 30-35 cycles were performed in DNA Eppendorf/Mastercycler gradient (Fischer's Scientific Laboratory). The analysis of 6 studied polymorphisms was based on pyrosequencing technology (bioluminometric real-time sequence determination): PCR products were sequenced using an automated PSQTM96 MA instrument (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden), according to the manufacture' protocol as previously described (46). For ERCC1, XPA, XPB, XPD and XRCC1 previous reported polymorphisms were analyzed e.g. respectively: ERCC1 118C>T (Asn118As), ERCC1 8092C>A, XPA (23A>G), XPB (445A>G), XPD 751A>C (Lys751Gln), and XRCC1 399G>A (Arg399Gln).

For each polymorphism, the specific primers sequences and PCR temperature profiles of amplification are detailed in the **Table 1**.

Statistical analysis

The overall survival time (OS) was defined by the period between the date of the start of treatment and the date of death, regardless of the cause. Progression-free survival (PFS) was defined by the period between the date of the start of treatment and the date of progression (clinical or radiological progression) or death. Patients without progression at the time of analysis were censored at their last available follow-up assessment. The χ^2 test was used to compare the allele frequency of each variant with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium. Each genotype was independently analyzed, and a combined analysis was planned if multiple genotypes showed a significant correlation. The log-rank test and Kaplan-Meier plots were used to evaluate the association of overall survival and time to progression with each of the following baseline prognostic factors studied in patients with advanced CRC: mucinous histology (well or moderate *vs* poor differentiation), number of metastatic sites (1 *vs* more), performance status (ECOG 0 or 1 *vs* 2), age (< 60, 61-70 and > 70 years) and ACE levels (normal *vs* > 3 UI/ml) at enrollment of study, and gender. The association of each polymorphism with survival and time to progression was analyzed singly using Kaplan-Meier plots, the log-rank test, the relative risk ratio, and its associated 95% confidence interval (CI) were calculate. Contingency tables (χ^2 test) and Fisher' exact test were used for categorical variables to evaluate the association of polymorphisms plus baseline data and the response or toxicity to chemotherapy. The α error risk was classically chosen at

5%. Finally the Cox-regression method was too used for toxicity risk and survival multivariate analysis and Spearmann correlation coefficient was used in univariate analysis. Statistical analysis was performed on SPSS© software (Chicago, USA).

RESULTS

Clinical data and genotype frequencies

A total of 118 patients, consisting of 70 men (59.3%), 48 women (40.7%) with a median age of 65 years (range: 35 - 81 years), who fulfilled the inclusion criteria, were evaluated in this study. The median follow-up was 1,426 days (3.9 years), ranging from 26.3 months (2.2 years) to 100.2 months (8.3 years). The clinical characteristics of eligible patients are summarized in **Table 2**. They were in agreement with epidemiological data in advanced colorectal cancer: 78% of patients had good performance status lower than 2, and the sex ratio was 1.45 for male. The metastasis site was unique in 68.6% of cases at enrollment of study, with liver metastasis in 82% among them. ACE was superior to normal level (> 3 UI/mL) in 70.3% (83 patients). Tumor's histologies were lieberkuhnian adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma in 89% and 11% respectively.

All patients were treated in first-line therapy (strict inclusion criteria).

Overall genotypes frequencies of the studied polymorphisms are depicted in **Table 3**. All genotypes are in close agreement with that predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. Our observed genotypes frequencies were the same with those described for Caucasians in previous reports (**30-32, 37-39; 42-44**). In summary, the analysis of the polymorphism ERCC1-118 showed that, 19 patients (16.1%) possessed an A/A genotype, 44 patients (37.3%) showed a C/C genotype, and 55 patients (46.6%) were heterozygous for this variant. For XPD Lys751Gln (A>C) genotype, in all, 20 patients (17.0%) were C/C homozygous and 54 patients (45.7%) showed an A/A wild type genotype. 44 patients (37.3%) presented a heterozygous A/C genotype concerning the XPD Lys751Gln polymorphism. For XRCC1 Arg399Gln (C>T) polymorphism, 56 (47.5%) and 49 (41.5%) patients showed homozygous (C/C) and respectively heterozygous (C/T) genotypes. Only 13 patients (11.0%) were T/T homozygous. In terms of the XPB K117R polymorphism, all the patients were homozygous wild type, confirming the observed frequencies described previously (**47**).

Finally for analysis according to safety and efficacy of FOLFOX-4 regimen, populations with different polymorphisms were homogeneous (e.g. without statistical difference between them) with respect to as well as age, performance, histologic, ACE status and gender. Such homogenous populations have allowed realizing Uni- and Multivariate analysis in avoiding bias linked to these well-known parameters in advanced colorectal cancer and in focusing on only genetic parameters.

Study of correlation between polymorphisms and toxicities

The different types of toxicity are described in **Table 4**: 386 adverse events (79.8% grade 1-2 side effects) were reported, especially asthenia (17.4%) and hematologic toxicities like neutropenia (11.1%) with 36 events (9.3%) of grade 3-4, thrombopenia (9.0%) with one grade 4 event, and anaemia (10.4%), but with only one grade 3 and no grade 4. G-CSF adjunction has to be necessary in 21.2%. 7% of patients suffered from grade 1-2 nausea, under setron-based antiemetic drugs. No case of cardiac toxicity was noticed. After previous detection of DPD SNPs (two patients had the relevant studied DPD gene SNP) and under pharmacokinetic follow-up, no severe 5-FU adverse events were notified (Hand-Foot syndrome or diarrheas grade 3 or 4) with only three grade 3 mucositis resolved by symptomatic treatment.

Concerning the specific oxaliplatin neurotoxicity, 27.7% of all side effects (and 90.6% of patients) were notified with 29 grade 3 events (27.1% of total neuropathies). Oxaliplatin was decreased by 20% in 30% during treatment setting and FOLFOX-4 regimen has to be stopped for severe toxicity in 59 (50%) of cases. Among these, 34 (57.6%) occurred for neurotoxicity, 22 (37.3%) for hematologic side effects (especially thrombopenia), 1 for both (1.7%) and 2 (3.4%) for allergic reaction.

At Univariate analysis, 2 genetic variants were significantly observed as potential predictive protective biomarkers for oxaliplatin-related neurotoxicity: T/T for ERCC1 118 C>T and A/A for XPD (Lys751Gln) A>C polymorphisms.

For the ERCC1-118 polymorphism, using the group of patients with a C/C genotype as a reference, the C/T group showed 2.214 fold (95% CI: 0.757; 6.480) ($p = 0,0255$) increased risk of neurotoxicity, whereas patients with the homozygous T/T genotype showed a lower relative risk of 0.719 (95% CI: 0.231; 2.237).

In terms of XPD-751 polymorphism, using the A/A genotype group as a reference we find that the group of patients with a C/C genotype showed 4.041 fold (95% CI: 1.368; 11.943) ($p = 0,0310$) increased risk of oxaliplatin-related neurotoxicity, whereas the patients with a heterozygous genotype showed an intermediate relative risk of 1.947 (95% CI: 0.871; 4.532).

These genotypes remains statistically significant for ERCC1 and XPD in Multivariate analysis with $p=0.0236$ and 0.0407 respectively (**Table 5**). Among patients with a homozygous C/C genotype for XPD Lys751Gln polymorphism, 10 patients (50%) have suffered from grade 3 neurotoxicity.

Finally no other statistical correlation has been observed between studied polymorphisms and other type of toxicity, notably hematological side effects.

Study of correlation between polymorphisms and responses

The overall response [OR] (complete response [CR] plus partial response [PR]) rate) was 77.1% at 3 months and 55.7% at 6, with 2.5% and 20.3% of complete response [CR] respectively (**Table 6**), considering metastasis surgery possibly already carried out at 3 months (1/3 cases). These surgeries were carried out in 37 (31.3%) patients with a median overall survival of 38.2 months (**Figure 1**) vs 16.6 for non-operative patients. Finally tailored FOLFOX-4 showed a consistent efficacy with 88.1% of disease-control patients after 3 months of treatment and 77.0% at 6 months. Response rates were superior than these described in previously studies using FOLFOX-4 in advanced colorectal cancer (**9-11; 48-51**). No studied genetic polymorphism was significant in Uni- or Multivariate analysis for predicting response to treatment in our study.

Study of correlation between polymorphisms and survivals

The overall survival (OS) rate was 76.7%, 30.6% and 12.5% at 1, 3 and 5 years respectively. The median overall survival time was 23.1 months. Median progression-free survival (PFS) time was 9.3 months in this study. Uni- and Multivariate Cox proportional hazard regression models for association of our 6 studied polymorphisms and progression-free survival were reported in **Tables 7**.

The progression-free and overall survival times of the patients with XRCC1 C/C or C/T for Arg399Gln (C>T) genotypes (n=74 (62.7%) patients of the global population) were statistically more than that of the patients with another genotype: 9.6 (PFS) and 24.6 months (OS) versus 6.2 (PFS) and 13.1 (OS) (p=0.005 for PFS and 0.01 for OS). So, patients who were identified with a T/T genotype for the XRCC1 Arg399Gln polymorphism demonstrated 2.327 fold (95% CI: 1.257; 4.306) (p = 0.0072) risk of a shorter overall survival compared with those with a C/C or a C/T genotype. The same group of patients has also 2.512 fold (95% CI: 1.376; 4.587) (p = 0.0027) risk of progression compared with the reference group.

The analyses of the others polymorphisms did not show significant associations between overall survival or survival-free progression.

DISCUSSION

Concerning safety and efficacy of cytotoxic drugs, a consistent variation exists in the global population and patients respond differently to identical medication. Growing evidence is that genetic polymorphisms are one of the major causes of these individual responses to drugs associated with sometimes severe adverse effects. Pharmacogenetic studies attempt to find the determinant genes involving in the drug metabolisms in order to select subgroups of patients with variable response to anticancer drugs (13-15).

Our exploratory pharmacogenomic collateral research was performed to study whether the 6 DNA repair constitutional polymorphisms within the 5-districted genes (ERCC1, XPD, XPB, XPA and XRCC1), alone or in combination, may have a predictive or prognostic value in oxaliplatin-related toxicity, clinical response and survival in a homogeneous cohort of 118 patients with advanced colorectal cancer treated in first line with 5-Fluorouracil, Leucovorin and Oxaliplatin (FOLFOX-4 regimen). The 6 different single nucleotide polymorphisms were assessed by pyrosequencing.

With pharmacokinetic dose adaptation for 5-FU, this treatment was tolerated well with 20.2% severe toxic side effects especially neuro- and hematological toxicity but without specific 5-FU adverse events (only three grade 3 mucositis), and with excellent overall response and survival rates. The overall response rate was 77.1% at 3 months and 53.4% at 6. The median overall survival and median progression-free survival times were 23.1 and 9.3 months respectively. Secondary metastasis surgeries were carried out in 37 (31.3%) patients with a median overall survival of 38.2 months. So FOLFOX-4 tailored by prior DPD genotyping combined with 5-FU pharmacokinetic monitoring, allowed to define a treatment schedule with as well an optimal efficacy – superior than described results in previous studies -, as a limited toxicity for 5-FU. So tailored FOLFOX-4 regimen will have to be generalized. Indeed nowadays, the majority of patients receive targeted therapies in addition to conventional chemotherapy. However a better management of cytotoxic drugs could still enhance such synergic associations increasing especially the likelihood for subgroup of patients with hepatic or pulmonary metastases to undergo secondary surgery with a benefit of prolonged disease-free survival.

The oxaliplatin-related neurological toxicity is a real problem of the chemotherapy management.

In our research, the incidence of neurotoxicity is an event often encountered, with a frequency of occurrence of severe neuropathy similar to that shown in previous studies (53). The grade 3 neurotoxicity was reported in 29 patients (24.58%) and in 78 patients (66.1% of cases) this toxicity has been identified as grade 1 and 2.

It has been indicated, for different types of cancer, that polymorphisms of genes involved in the repair of alkylating DNA adduct and DNA base damage may play a role in the treatment effectiveness (12; 31; 43; 54-55). In our study, patients who showed a homozygous mutant genotype for XPD Lys751Gln polymorphism were also more likely to develop a severe neurotoxicity.

Regarding ERCC1 Asn118Asn polymorphism, we have indicated that it has been associated with grade 3 or 4 neutropenia. In fact, patients with C/T genotype have generally shown more risk of severe neurotoxicity, compared with other genotypes. The identification of the SNP of ERCC1 as a predictor genetic factor of neurological toxicity of platinum salts regimens was also showed in gastric cancer (38). Other researches conducted on several types of cancer (ovarian cancer or small cell lung) have stressed the association of this SNP with treatment efficacy, but not with the occurrence of severe neurotoxicity (56).

To the best of our knowledge, this is the first study reporting such observational results. Actually, ERCC1-118 and XPD-751 products are two major components of the NER system involving in the repair of oxaliplatin-induced DNA damage (28; 52). Several clinical studies showed a possible correlation between ERCC1-118 T allele variant or XPD-751 Gln allele and a poorer clinical outcome (30-33; 37-39) but never with neurotoxicity linked to oxaliplatin. We could yet do the assumption that the main mechanism involved in neurotoxicity could be a default of repair after oxaliplatin exposition in glial structures of neurons especially in the dorsal root ganglia and peripheral nerves. Further *in vitro* and *in vivo* plus clinical studies must to be investigated to confirm this hypothesis.

As regards the identification of predictive genetic markers of survival, in our study several polymorphisms have shown interesting results in relation to the association with survival, either overall survival or progression-free survival.

It was shown that among patients with advanced colorectal cancer treated with association 5-FU/oxaliplatin (FOLFOX-4 tailored), second and third line after failure of 5-FU or irinotecan, XPD Lys751Gln polymorphism was seen as a bad prognostic factor for overall survival (36; 54). Comparable observations have also been reported in studies carried on bigger groups. However, the exact consequences of this polymorphism on NER activity and interactions with

other close partners (including ERCC1) are not completely known, the reported results are quite contradictory.

Despite the research activist for the prognostic role of XPD on the survival of patients with colorectal cancer treated with platinum-based chemotherapy, in our study we have not confirmed this result.

Regarding the impact of the ERCC1 Asn118Asn polymorphism on survival, the results are still less clear. Altogether it was observed, both in colorectal cancer than in gastric cancer, that the ERCC1 mRNA levels are inversely correlated with survival (**12; 57**). Other studies have revealed completely different results, indicating a better prognosis for patients with C/C genotype (**31**).

In our research we noticed that patients with a homozygous mutant genotype, presented a progression-free survival longer compared to other patients. However the differences between groups were not significant ($p = 0.099$).

Concerning correlation between germline polymorphisms of our 5 candidate genes and clinical outcome in advanced colorectal cancer under FOLFOX-4 regimen, XRCC1 Arg399Gln (C>T) appear to be good prognosis biomarkers for overall and progression-free survivals and could be considered in order to optimize based 5-FU regimens. The progression-free and overall survival times of the patients with XRCC1 C/C or C/T for Arg399Gln (C>T) genotypes ($n=74$ (62.7% patients of the global population) were statistically more than that of the patients with another genotype: 9.6 (PFS) and 24.6 months (OS) versus 6.2 (PFS) and 13.1 (OS) ($p=0.005$ for PFS and 0.01 for OS).

The results of our research confirm those obtained by another team who reported an improved response to Oxaliplatin if favorable genotype (**43**).

In conclusion, we identified several polymorphisms linked with subgroups of patients at higher risk of neurotoxicity or at risk of poorer clinical outcome under oxaliplatin-based chemotherapy. These retrospective results must to be interpreted with caution: it appears difficult to investigate the effects of one or several polymorphisms during all metastatic treatment setting. Indeed much interference linked to clinical status or to different lines with combination and possibly targeted therapies, can lead statistical confusions. However our present study appears relevant with a homogenous cohort, in early-stage in disease setting (first-line), and with an analysis of genotypes involved in independent biologic pathways.

REFERENCES

1. Shah M. & Schwartz G. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(8), 2168-81.
2. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate [see comments]. *J Clin Oncol* 1992; 10(6):896-903.
3. De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 33:214-219, 1997
4. Schmoll H.J. Development of treatment for advanced colorectal cancer: Infusional 5-FU and the role of new agents. *Eur J Cancer* 32A:S18-S22, 1996 (suppl 5)
5. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiulo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 136-147.
6. De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947.
7. Douillard J.Y, Cunningham D, Roth A, Navarro M, James RD, Karosek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. *Lancet* 2000; 355: 1041-1047.
8. Saltz L.B, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MT, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 906-914.
9. Tournigand C, Louvet C, Quinaux E, André T, Lledo G, Flesch M, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX versus FOLFOX followed by FOLFIRI in metastatic colorectal cancer (MCRC): final results of a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 124a.
10. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1209-1214.
11. Simpson D, Dunn C, Curran M, Goa KL. Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2003; 63(19): 2127-2156.
12. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong Y, Uetake H, Danenberg K. et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer

- patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19(23), 4298-304.
13. Sekine I, Saijo N. Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann Oncol* 2001; 12:1515-1525.
 14. Stohlmacher J. Pharmacogenetics in gastro-intestinal tumors. *Onkol* 2005; 28:435-440.
 15. Marsh S, & McLeod H.L. Cancer pharmacogenetics. *Br J of Cancer* 2004; 90:8-11.
 16. Faivre S, Chana D, Salinasb R, Woynarowskab B, Woynarowski J.M. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66, 225–237.
 17. Woynarowski J, Chapman W, Napier C, Herzig M, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol* 1998; 54, 770–777.
 18. Woynarowski M, Herzig S.F.M, William B.A, Chapman G, Trevino A, Raymond E. et al. Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA. *Mol Pharmacol* 2000; 58, 920–927.
 19. Reardon J, Vaisman A, Chaney S, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-ammine dichlorocyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* 1999; 59, 3968–3971.
 20. Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, Schilf A, Gastiaburu JJ, Brienza S, et al. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann of Oncol* 1996; 7:95-98.
 21. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, William GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004; 9:8-12.
 22. Ashley AC, Sargent DJ, Alberts SR, et al. Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX): intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110:670-677.
 23. Perez R.: Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *EurJ Cancer* 1998; 34, 1535-42.
 24. Stewart D. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63, 12-31.
 25. Agarwal R, Kaye S. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev* 2003; 3, 502-16.
 26. Bergstralh DT, Sekelsky J. Interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? *Trends Genet.* 2008 Feb; 24(2):70-6. Epub 2008 Jan 14. Review.
 27. Friedberg E.C. DNA damage and repair. *Nature* 2003; (421) 436-440.

28. Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair: II. From yeast to mammals. *Trends Genet* 1993; 9:211-217.
29. Park C. & Sancar A. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1 and ERCC4 (XPF) excision repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 5017-21.
30. Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin J.C, et al. ERCC1 Codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-Fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17): 6212-6217.
31. Park D.J, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3):162-166.
32. Chang P.M, Tzeng C.H, Chen P.M, Lin J.K, Lin T.C, Chen W.S, et al. ERCC1 codon 118 C>T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2008 [Epub ahead of print].
33. Braithwaite E, Wu X, Wang Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat Res* 1999; 424(1-2):207-219.
34. Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson L.H, Prakash L, Prakash S. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* 1993; 365(6449):852-855.
35. Coin F, Bergmann E, Tremeau-Bravard A, Egly JM. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *Embol J* 1999; 18(5):1357-1366.
36. Park D, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz H. A xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61, 8654-8658.
37. Keam B, Im SA, Han SW, Ham HS, Kim MA, Oh DY, et al. Modified FOLFOX-6 chemotherapy in advanced gastric cancer: results of phase II study and comprehensive analysis of polymorphisms as a predictive and prognostic marker.
38. Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, et al. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2009 [ahead of print].
39. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in

- gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(6):1797-1803.
40. Monzo M, Moreno I, Navarro A, Ibeas R, Artells R, Gel B. et al. Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine. *Oncology* 2007; 72 (5-6), 364-70.
 41. Hansen R, Sørensen M, Tjønneland A, Overvad K, Wallin H, Raaschou-Nielsen, et al. XPA A23G, XPC Lys939Gln, XPD Lys751Gln and XPD Asp312Asn polymorphisms, interactions with smoking, alcohol and dietary factors, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res.* 2007; 619(1-2), 68-80.
 42. Skjelbred CF, Saebo M, Wallin H, Nexø BA, Hagen PC, Bowitz Lothe IM, Aase S, et al. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a norwegian cohort: a case control study. *BMC Cancer* 2006; 6:67.
 43. Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21(4B):3075-3079.
 44. Wang Z, Xu B, Lin D, Tan W, Leaw S, Hong X, et al. XRCC1 polymorphisms and severe toxicity in lung cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy in Chinese population. *Lung Cancer* 2008; 62:99-104.
 45. Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M.; Delva, R.; Regimbeau, C.; Cailleux, P.; Alleaume, C. et al. Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 1998; 16(4), 1470-1478.
 46. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A and Gamelin E. Influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2007 August; [Epub ahead of print].
 47. Butkiewicz D, Rusin M, Harris C. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in a Polish population. *Human Mutat* 2000; 15, 577-8.
 48. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: Current options, current evidence. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4553-4560.
 49. Wicherts DA, de Haas RJ, Adam R. Bringing unresectable liver disease to resection with curative intent. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33 (Suppl 2); S42-51.
 50. Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240: 644-657.

51. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9249.
52. Bergstralh DT, Sekelsky J. Interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? *Trends Genet.* 2008 Feb; 24(2):70-6. Epub 2008 Jan 14. Review.
53. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Loriot M. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(10), 3050-6.
54. Stoecklacher J, Park D, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S. et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(2), 344-54.
55. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F. et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25, 1247-1254.
56. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S. et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11, 1534-1538.
57. Metzger R, Leichman C, Danenberg K, Danenberg P, Lenz H, Hayashi K. et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1998; 16(1), 309-16.

TABLES

Table 1: Primer sequences and PCR conditions for ERCC1, XPA, XPB, XPD and XRCC1 SNP analysis

<i>Gene (Site)</i>	Primer sequences 5' → 3'	<i>Anneling T_m (°C)</i>
ERCC1 Asn118Asn (118C>T)	(up) TGTGGTTATCAAGGGTCATCC (down) *CCAGCACATAGTCGGGAATTA (seq) ACTGAAGTTCGTGCG	58.0
ERCC1 3'UTR (8092C>A)	(up) *CCGGGGGCAGACTACACA (down) AGAGACAGTGCCCCAAGAGG (seq) GGACAAGAAGCGGAA	58.0
XRCC1 Arg399Gln (399C>T)	(up) *CCCAAGTACAGCCAGGTCCTA (down) TGACTCCCCTCCAGATTCTT (seq) CGTGTGAGGCCTTACC	58.0
XPB K117R (445A>G)	(up) ATCTCTCAGGCTCCCGATGG (down) *TTGCAGCCCAACGCTGAC (seq) CCCATGTGCATGAGT	62.0
XPA 5'UTR (23A>G)	(up) TGGAGCTGGGAGCTAGGTC (down) *CTCCGCGGGTTGCTCTAA (seq) AGGTCCTCGGAGTGG	56.0
XPD Lys751Gln (751A>C)	(up) CGCTCTGGATTATACGGACATCTC (down) *GGAGTCACCAGGAACCGTTTAT (seq) GCTAGAATCAGAGGAGACG	58.0

* Biotinylated primer

Table 2: Patients and tumor' initial clinical characteristics

<i>Clinical data</i>		<i>Number (%)</i>
Gender	Male	70 (59.3)
	Female	48 (40.7)
PS	0-1	92 (78.0)
	2-3	26 (22.0)
Median age (years)		65.0
Range (years)		35-81
Tumor histology	Lieberkuhnian	105 (89.0)
	Mucinous	13 (11.0)
Initial ACE levels	Normal	35 (29.7)
	> 3 UI/mL	83 (70.3)
Tumor site	Colon	77 (65.3)
	Rectum	41 (34.7)
Metastatic site		
Number of sites	1	81 (68.6)
	2	30 (25.4)
	≥ 3	7 (6.0)
Synchronous Metastasis		109 (92.4)
Location unique site	Liver	66 (81.5)
	Lung	11 (13.6)
	Peritoneal, Carcinomatosis or nodes	4 (4.9)

Table 3: Distribution of studied polymorphisms in global population

SNP		Nb of patients	Frequency (%)	Allele frequency	
				<i>p</i>	<i>q</i>
<i>ERCCI</i> Asn118Asn	C/C	19	16.1	0.39	0.60
	C/T	55	46.6		
	T/T	44	37.3		
<i>XRCCI</i> Arg399Gln	C/C	56	47.5	0.68	0.32
	C/T	49	41.5		
	T/T	13	11.0		
<i>XPA</i> 5'UTR	A/A	20	17.0	0.35	0.65
	A/G	43	36.4		
	G/G	55	46.6		
<i>XPB</i> K117R	A/A	118	100.0	1	
<i>XPD</i> Lys751Gln	A/A	54	45.7	0.65	0.35
	A/C	44	37.3		
	C/C	20	17.0		

Table 4: Distribution of the toxic side effects under FOLFOX-4 regimen

	<i>Grade 1+2</i>	<i>Grade 3+4</i>	<i>Total (n)</i>
Neuropathy	78	29	107
Mucositis	14	3	17
Conjunctival effects	11	0	11
Diarrhoea	3	0	3
Hand-foot syndrome	14	0	14
Cardiac effects	0	0	0
Neutropaenia	7	36	43
Thrombopaenia	31	4	35
Anaemia	39	1	40
Nausea	27	0	27
Alopecia	22	0	22
Asthaenia	62	5	67
Total (n)	308	78	386

Table 5: Uni- and Multivariate Cox Proportional Hazard Regression models for association of genetic variables with oxaliplatin-neurotoxicity (grade >2)

<i>Univariate</i>		<i>Logistic Regression</i>	
		OR [CI 95%]	p
ERCC1	C/C	1	0,0255
	C/T	2.214 [0.757; 6.480]	
	T/T	0.719 [0.231; 2.237]	
XPB	A/A	1	0,0310
	A/C	1.947 [0.871; 4.532]	
	C/C	4.041 [1.368; 11.943]	

Table 6: Objective response rates

	<i>Nb of patients (%)</i> <i>(at 3 months)</i>	<i>Nb of patients (%)</i> <i>(at 6 months)</i>
Complete Response (CR)	3 (2.5)	23 (20.3)
Partial Response (PR)	88 (74.5)	40 (35.4)
Overall Response (OR)*	91 (77.1)	63 (55.7)
Disease Control	104 (88.1)	87 (77.0)
Disease Progression	14 (11.9)	26 (23.0)

NB: At 6 months, 5 patients were dead.

* OR = CR + PR

Table 7. Univariate Cox Proportional Hazard Regression models for association of genetic variables with Overall Survivals or Progression-free Survival (N = 118)

Univariate	Overall Survival		Progression-free Survival	
	OR [IC _{95%}]	p	OR [IC _{95%}]	p
<i>ERCC1 (Asn118Asn)</i> ♦*		0,5661		0,1139
C/C				
C/T	1		1	
T/T	1,146 [0,638; 2,059]		1,298 [0,758; 2,224]	
	0,901 [0,490; 1,656]		0,837 [0,480; 1,460]	
<i>ERCC1 (3'UTR)</i> ♦*		0,8600		0,9866
A/A				
A/C	1		1	
C/C	0,804 [0,369; 1,751]		1,046 [0,504; 2,170]	
	0,835 [0,396; 1,759]		1,014 [0,503; 2,045]	
ERCC1_CD*		0,3391		0,0684
C/C + C/T	1		1	
T/T	0,815 [0,535; 1,240]		0,695 [0,470; 1,028]	
<i>XPA (5'UTR)</i> ♦*		0,1604		0,9440
G/G	1		1	
G/A	1,305 [0,828; 2,057]		1,053 [0,693; 1,599]	
A/A	1,696 [0,969; 2,970]		0,961 [0,569; 1,623]	
<i>XPD (Lys751Gln)</i> ♦*		0,9026		0,7648
A/A				
A/C	1		1	
C/C	1,098 [0,699; 1,724]		0,874 [0,578; 1,323]	
	1,100 [0,632; 1,913]		0,862 [0,509; 1,458]	
<i>XRCC1 (Arg399Gln)</i> ♦*		0,0269		0,0057
C/C				
C/T	1		1	
T/T	0,986 [0,638; 1,526]		0,778 [0,519; 1,165]	
	2,312 [1,209; 4,419]		2,258 [1,212; 4,210]	
XRCC1_CD		0,0072		0,0027
C/C + C/T	1		1	
T/T	2,327 [1,257; 4,306]		2,512 [1,376; 4,587]	
<i>XRCC1 and ERCC1</i>		0,3182		0,0268
The others	1		1	
T/T	1,585 [0,642; 3,913]		2,569 [1,114; 5,920]	

* Do not meet the assumption of proportionality of risk to the progression-free survival

♦ Does not meet the assumption of proportionality of risks to overall survival

FIGURES

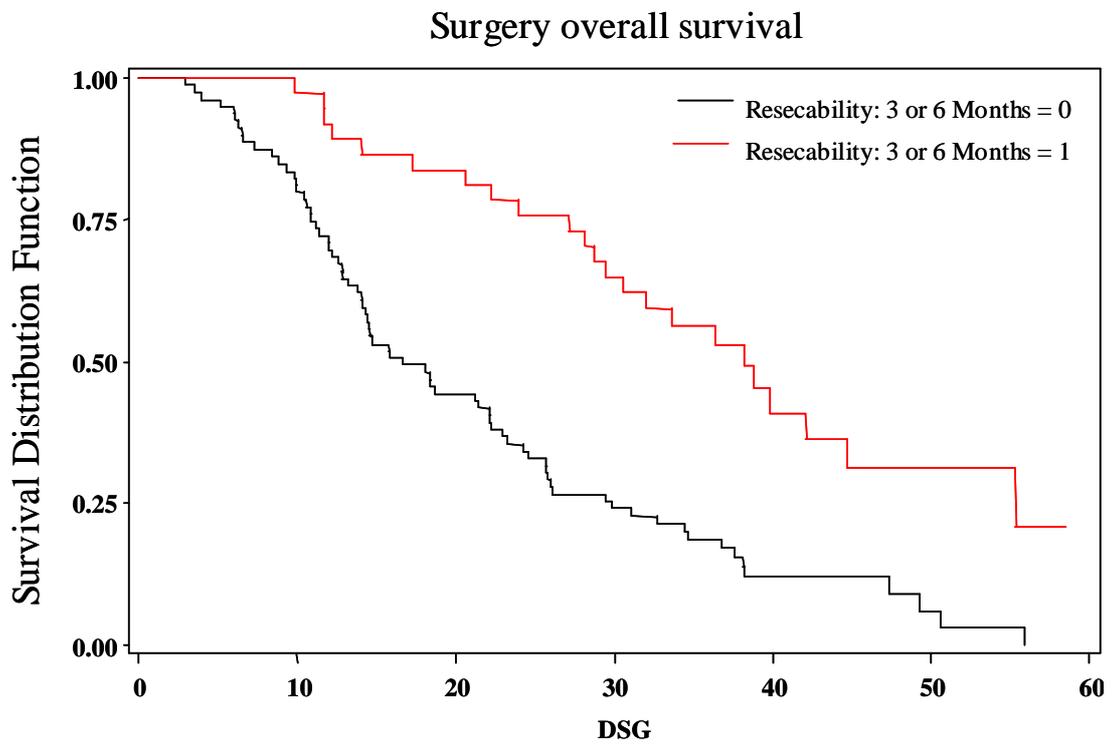


Figure 1. Univariate overall survival of patients according to secondary carried out metastasis surgery (in bold).

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Predictive Factors of Oxaliplatin Neurotoxicity: The Involvement of the Oxalate Outcome Pathway

Laurence Gamelin,⁴ Olivier Capitain,³ Alain Morel,¹ Agnes Dumont,¹ Sory Traore,² Le Bouil Anne,⁵ Simard Gilles,⁶ Michele Boisdron-Celle,¹ and Erick Gamelin^{1,3}

Abstract **Purpose:** Oxaliplatin displays a frequent dose-limiting neurotoxicity due to its interference with neuron voltage-gated sodium channels through one of its metabolites, oxalate, a calcium chelator. Different clinical approaches failed in neurotoxicity prevention, except calcium-magnesium infusions. We characterized oxalate outcome following oxaliplatin administration and its interference with cations and amino acids. We then looked for genetic predictive factors of oxaliplatin-induced neurotoxicity.

Experimental Design: We first tested patients for cations and oxalate levels and did amino acid chromatograms in urine following oxaliplatin infusion. In the second stage, before treatment with FOLFOX regimen, we prospectively looked for variants in genes coding for the enzymes involved (a) in the oxalate metabolism, especially glyoxylate aminotransferase (AGXT), and (b) in the detoxification glutathione cycle, glutathione S-transferase π , and for genes coding for membrane efflux proteins (ABCC2).

Results: In the first 10 patients, urinary excretions of oxalate and cations increased significantly within hours following oxaliplatin infusion, accompanied by increased excretions of four amino acids (glycine, alanine, serine, and taurine) linked to oxalate metabolism. In a further 135 patients, a minor haplotype of AGXT was found significantly predictive of both acute and chronic neurotoxicity. Neither glutathione S-transferase π nor ABCC2 single nucleotide polymorphisms we looked for were linked to neurotoxicity.

Conclusion: These data confirm the involvement of oxalate in oxaliplatin neurotoxicity and support the future use of AGXT genotyping as a pretherapeutic screening test to predict individual susceptibility to neurotoxicity.

Oxaliplatin, a platinum-based chemotherapeutic agent with a 1,2-diaminocyclohexane (DACH) carrier ligand, displays a characteristic pattern of neurotoxicity, which is the most frequent dose-limiting toxicity, with an acute onset of distal dysesthesia and/or paresthesia, induced or exacerbated by cold and prolonged muscular contraction after a voluntary contraction. Although these symptoms that occur during or short after infusion are transient and generally mild, when treatment is continued, a persistent sensory peripheral neuropathy can develop, eventually causing superficial and deep sensory loss,

sensory ataxia, and functional impairment (1). The mechanism of chronic neurotoxicity evoked by some authors is close to that of cisplatin—being the progressive accumulation of a heavy metal, the DACH platinum, in neurons and the implication of the detoxication system of glutathione (2).

However, clinical neurophysiologic examinations and nerve biopsy studies have shown that patients displaying sensory symptoms have no signs or very mild signs of axonal degeneration (1). Oxaliplatin has a direct “pharmacologic” effect on the excitability of sensory neurons and muscle cells that has not previously been described with other platinum agents (3). Furthermore, the acute symptoms induced by oxaliplatin are similar to those induced by several drugs or toxins acting on neuronal or muscular ion channels, such as tetrodotoxin (4). Our team and another reported in different cellular models that acute oxaliplatin action on neurons is due to a specific interaction with sodium channels located in the cell membrane (5, 6). Furthermore, we showed first that a peculiar population of Na⁺ channels was involved, probably Ca²⁺-dependent Na⁺ channels, and second that this effect was not reproduced by its cytotoxic metabolite, DACH platinum, but by the other one, oxalate, both the hydrolyzable ligand and a calcium chelator, known for its acute neurotoxic effects, in case of acute poisoning, such as ethylene glycol poisoning (5, 7). Then, oxaliplatin affects voltage-gated sodium channels indirectly through its transformation into one of its metabolites, oxalate, by interfering with intracellular divalent cation

Authors' Affiliations: ¹Laboratory of Oncopharmacology-Pharmacogenetics, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U564 and ²Unit of Biostatistics, Anticancer Centre Paul Papin; ³Gastrointestinal-Tract Oncology Unit, Regional Institute of Cancer Anjou-Maine; ⁴Antipoison-Toxicovigilance Centre; ⁵Laboratory of Pharmacology-Toxicology, and ⁶Laboratory of Biochemistry, University Hospital Larrey, Angers, France

Received 3/21/07; revised 5/25/07; accepted 7/18/07.

Grant support: Comité Départemental du Maine-et-Loire de La Ligue Contre le Cancer.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked **advertisement** in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Erick Gamelin, Anticancer Centre Paul Papin, 2 rue Moll, 49933 Angers, France. Phone: 33-241352700; Fax: 33-241483190; E-mail: e.gamelin@unimedia.fr.

© 2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0660

regulation in neuronal systems (i.e., calcium and/or magnesium) and by disrupting their intracellular homeostasis (8). Based on these results, we set up an oxalate chelation strategy using calcium-magnesium infusions just before and just after oxaliplatin administration and showed its potential for the prevention of neurotoxicity (9).

In total, two different mechanisms of neurotoxicity have been hypothesized. The classic one is that of heavy metals, such as cisplatin, involving the detoxication process (i.e., the glutathione system), especially glutathione S-transferase π (GST π), and certain membrane efflux proteins, such as multidrug-related protein 2 (MRP2; refs. 10, 11). The second mechanism is the repeated and prolonged interference of oxalate with voltage-gated sodium channels, resulting in acute or chronic neurotoxicity (12).

Oxalate synthesis and outcome are closely linked to those of glyoxylate, itself produced from serine, glycine, and alanine metabolisms, used by the liver to produce glucose (13, 14). Glyoxylate is detoxified by alanine glyoxylate transferase (AGT), exclusively in peroxisomes, through its transformation in glycine in a reaction coupled to alanine conversion in pyruvate. In the cytosol, glyoxylate is metabolized into glycolate by glyoxylate reductase-hydroxypyruvate reductase (GRHPR; Fig. 1). The main role of this enzyme is to prevent the accumulation of glyoxylate in the cytosol, converting it into glycolate (15). The last catabolic pathways of glyoxylate are its transformation in oxalate by lactate dehydrogenase in cytosol. It usually remains minor because AGT detoxifies most of glyoxylate, consequently considerably limiting its oxidation in oxalate.

A deficiency in one of these two enzymes, AGT and GRHPR, known as genetic disease, can lead to an abnormal accumulation of oxalate called hyperoxaluria (16). AGXT gene variants are very rare, but besides the genetic disease, two variants are frequent, the wild-type known as a major allele and less frequent minor allele, found in 20% of Caucasian patients, a haplotype characterized by three mutations: two substitutions Pro11Leu and Ile1142Met and a duplication of 74 bp (17). Only Pro11Leu single nucleotide polymorphism has a phenotypic effect. It reduces AGT catalytic activity by 3 in homozygote patients (i.e., 4% of Caucasian patients; ref. 18).

GRHPR variants, leading to the formation of a truncated protein or to the loss of catalytic enzyme activity (965T>C, 103 delG), are very rare (19).

Because glyoxylate is an intermediate step of the two metabolic pathways of oxalate, we hypothesized that patients

with a partial deficiency of one of these enzymes could be at high risk of neurotoxicity after oxaliplatin infusion because they would not be able to manage repeated acute and high levels of oxalate production.

In the present study, we wanted to further characterize the oxalate outcome and effect after oxaliplatin infusion and to determine predictive factors of neurotoxicity in clinical practice that could allow their pretherapy detection and leading to neuroprevention.

Therefore, we carried out two prospective studies. First, we sought to characterize the metabolic effect on patients treated with oxaliplatin. We tested urine for oxalate, cations, and amino acids involved in the oxalate and the glyoxylate metabolism. Second, we looked for a correlation between oxaliplatin-induced neurotoxicity and polymorphisms of the two most important enzymes, AGT and GRHPR, involved in the metabolic pathway of oxalate, the glyoxylate-oxalate metabolism. On the other hand, we investigated in the same population of patients the hypothesis of a cisplatin-like neurotoxicity genesis, involving a deficiency in the cell detoxification pathway of heavy metals, especially the glutathione cycle and the ATP-binding cassette family. We characterized polymorphisms of GST π and MRP2, also called ABCC2 (10, 11, 20).

Materials and Methods

Patients

These two observational prospective studies were carried out on French Caucasian patients treated for advanced carcinomas with biweekly oxaliplatin + 5-fluorouracil and folinic acid (FOLFOX regimen; ref. 21): 85 mg² oxaliplatin on day 1 plus a 5-fluorouracil 400 mg/m² bolus and 2,500 mg/m² 46-h infusion plus 200 mg/m² folinic acid on days 1 and 2. In the second study, with FOLFOX regimen, taking into account the interest of calcium and magnesium infusions in term of neurotoxicity prevention, patients received 1 g of calcium gluconate and 1 g of magnesium sulfate in 15-min infusion just before and just after oxaliplatin infusion, as published previously (9). To be eligible, patients had to be naive of oxaliplatin, to have a WHO performance status <2, no preexisting neuropathy, a life expectancy of at least 3 months, an age lower than 80 years, and adequate hematologic and cardiac status.

The relevant Ethical Committee stated that this observational study was not submitted to the French Huriet-Serusclat law. Written informed consent was obtained from all patients before pretherapeutic genotyping (135 patients) or urine sampling (10 patients). Results of pretherapeutic genotyping were not taken into account. The 5-fluorouracil dose was adjusted individually, as is usually done in our institution as routine practice, beginning with the second cycle based on a pharmacokinetic follow up, as previously published (22). Fluorouracil concentrations in plasma were measured in the Oncopharmacology Department (23).

Assessment of tolerability

Patients were examined biweekly, with historical and physical examination. They were asked for treatment tolerance and underwent examinations with hemograms, ionograms, and liver and kidney tests before every chemotherapy cycle.

Response evaluation was carried out after three cycles by comparing tumor measurements before and after 3 months of treatment. Treatment was then prolonged up to a total of at least 6 months, except for progressive disease.

All adverse events were taken in account and graded for severity according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria

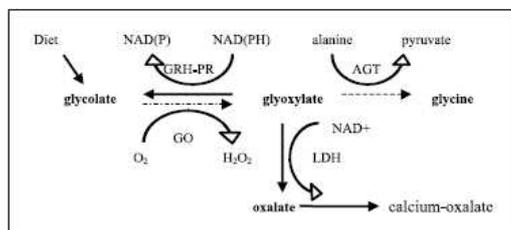


Fig. 1. The metabolism of oxalate and glyoxylate. The implications of enzymes and links with certain amino acids. GO, glycolate oxydase (EC1.1.3.15); LDH, lactate dehydrogenase. Solid arrows, cytosol; dashed arrows, peroxisome.

(NCI-CTC) scale. Treatment had to be stopped in case of grade 4 toxicity and the French Drug Committee had to be notified. The safety assessment of oxaliplatin + 5-fluorouracil/leucovorin treatment included the following. (a) Neurologic safety: Acute and chronic, peripheral and perioral neuropathy, pseudolaryngospasm, laryngeal dysesthesia, muscular contractions, motor troubles, stiffness, and muscular pain. Both the NCI-CTC version 1 scale and the specific Levi-modified neurotoxicity scale were used (24). Actually, although the Levi-modified scale seems very useful for treatment adjustment and neurotoxicity managing, NCI-CTC scale remains more suitable for neurotoxicity assessment. (b) Other toxic side effects, such as myelotoxicity and digestive tract toxicity, especially diarrhea. (c) Other general variables, such as asthenia and weight loss.

The cumulative doses of oxaliplatin, dropouts, for whatever reason were also assessed. In the event of a case of significant grade 2 neurotoxicity, the oxaliplatin dose remained unchanged, but the cycle could be delayed until resolution. In cases of recurrence, the dose was reduced by 20%. In the case of grade 3 toxicity, treatment was interrupted until resolution of the toxic manifestations and then restarted with a 20% decrease of the dose. In the event of a significant grade 2 hematotoxicity, the oxaliplatin dose remained unchanged, but the cycle was delayed until resolution. In case of recurrence, the dose was reduced by 20%. In the case of grade 3 toxicity, treatment was interrupted until resolution of the toxic manifestations and then restarted with a 20% decrease of the dose.

Methods

First study. We measured (a) Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and K⁺ concentrations in plasma at H0, H2 (before and just after the end of oxaliplatin infusion), H5, day 8, and day 15 and (b) oxalate, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and K⁺ concentrations in urine, weighed by urine creatinine at H0 (before oxaliplatin infusion), H5, day 8, and day 15. Urine samples were collected as follows: urine samples of the previous 24 h before oxaliplatin administration for H0, urine samples between H0 and H5 for H5, and 24-h urine samples for days 8 and 15.

We also characterized the urinary elimination of different amino acids with urine amino acid chromatography.

Second study. We genotyped AGXT, GRHPR, GSTπ, and MRP2. We looked for the most relevant mutations of the AGXT gene. They are listed on Table 1. Some of them are rare, involved in type 1 hyperoxaluria (15, 16). They are located on exons 1, 4, 7, and 10. Three of them are more frequent and characterize two haplotypes: the "major haplotype" and the less frequent "minor haplotype" (25). They are constituted of three variants located on exon 1, 154C>T (Pro111Leu), on exon 4, the duplication of 74 bp, and on exon 10, 1142A>G (Ile340Met). The minor haplotype is found in 20% of northern American and European populations (25).

On the GRHPR gene, we looked for six variants leading to splicing errors and to a truncated protein with the loss of cofactor or enzyme substrate binding site or the loss of catalytic activity: four variants located on exons 2, 6, and 9 and two variants on introns 4 and 7: 103delG located on exon 2, del AAGT on intron 4, and four single nucleotide polymorphisms: 295C>T (Arg99Stop), 965T>G (322Met>Arg), 494G>A (165Gly>Asp), and G>A on the 3' splicing region of intron 7 (26).

About GSTπ, two variants were looked for: 313A>G (exon 5, 105Ile>Val) and 341C>T (exon 6, 114Ala>Val). Four haplotypes have been defined: GSTP1A (Ile105-Ala114), GSTP1B (Val105-Ala114), GSTP1C (Val105-Val114), and GSTP1D (Ile105-Val114; refs. 10, 11). As results in the literature about their implication in the pathogeny of neurotoxicity were contradictory, we looked for these GST variants.

For MRP2, we looked for two variants: 224C>T and 3972C>T (20).

WBC isolation and DNA extraction

Blood samples were obtained for DNA isolation and the determination of genotypes. All procedures were reviewed and approved by accredited ethics review boards, and patients signed informed consent

Table 1. The variants of AGXT, GRHPR, GSTπ, and ABCC2 genes being looked for

Variants	Amino acids
AGXT	
154C>T	111Pro>Leu
155C del	Codon 45 stop
156Cins	Codon 167 stop
Duplication 74 bp intron 1	
576T>A	152Phe>Ile
588G>A	156Gly>Arg
630G>A	170Gly>Arg
640G>A	173Cys>Tyr
819C>T	233Arg>Cys
820G>A	233Arg>His
853T>C	244Ile>Thr
860G>A	246TrpStop
A1119T	Arg333Stop
A1142G	Ile340Met
GRHPR	
103Gdel (codon 35)	45LeuStop
295C>T	99ArgStop
[AAGT]del	Splicing error (codon 135 stop)
494G>A	165Gly>Asp
G/A intron G	Deletion of exon 8
965T>G	Met322Arg
GSTπ	
313A>G	Ile105Val
341C>T	Ala114Val
ABCC2	
24C>T	
3972C>T	

form. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (500 μL of whole blood) using a DNA isolation kit for blood/bone marrow/tissue (Roche Molecular Diagnostics). Each sample was controlled with respect to DNA isolation by UV transillumination of ethidium bromide-stained gels from subsequent electrophoretic separation in 1.2% agarose.

Pyrosequencing analysis

PCR conditions. PCR was done with an initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 50 cycles of denaturation for 30 s at 95°C, primer annealing for 30 s at 60°C, and extension for 1 min at 72°C followed by a final extension for 5 min at 72°C. All amplification reactions were done in a DNA Thermal Cycler Eppendorf, with 1 unit of Taq polymerase (Euroblue Taq, Eurobio).

PCR conditions were the same for the different mutations tested. Annex 1 (Table 5) shows the different sets of primers used to amplify the sequences of interest.

Choice of the sequencing primers. Different sequencing primers were designed to carry out AGXT, GRHPR, GSTπ, and MRP2 gene pyrosequencing analysis. Then, a selection was made based on the ability to provide interpretable Pyrograms. DNA products consisted of amplified genomic DNA from control subjects.

Conditions for the pyrosequencing analysis. Templates for the pyrosequencing analysis were prepared as recommended by the manufacturer. Real-time pyrosequencing was done at 28°C in an automated 96-well pyrosequencer using PSQ SNP 96 enzymes and substrates (Pyrosequencing AB). Before analysis, the enzymes and each of the four deoxynucleotide triphosphates (PSQ 96 SNP Reagent kit, Pyrosequencing AB) were loaded into a special cartridge that was mounted in the PSQ instrument. The 96-well microplate on which samples were annealed with their respective sequencing primers is designed to fit onto a socket in the PSQ 96 system. To apply the pyrosequencing technique to our work and to provide accurate results, different variables were modified and tested (27, 28).

Statistical analysis

Frequencies of the different gene variants and the toxic side effects were measured and then compared. Correlations were looked for to assess whether statistical difference existed between two observations (i.e., between two percentages relative to toxic event occurrence). Pearson's χ^2 test was used.

Neurotoxicity, the outcome variable, had four categories: grades 0, 1, 2, and 3. This ordinal variable was crossed with each categorical variable and tests of χ^2 allowed assessing statistically significant associations. Taking into account the ordinal nature of the outcome variable, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were done to complete the χ^2 tests.

The age, the cumulative administered dose, and the body surface were assumed quantitative, and then their different associations with the neurotoxicity were examined using one-way ANOVA. For a comparison between two groups (e.g., grade 0-1 versus grade 2-3), the *t* test was used.

Stepwise multivariate logistic regression model was used to assess the ability of covariables to predict neurotoxicity. The χ^2 goodness of fit, odds ratios, and 95% confidence intervals were provided. In this analysis, covariables were the statistically significant ($P < 0.05$) associated variables in the univariate analyses.

By using the covariables, this method allowed an optimal discrimination between the patients who had neurotoxicity (grades 2 and 3) and those who had not (grades 0 and 1). At each step, the covariable that brought most of information got in the model. Then, the diffuseness of information made by two associated covariables was avoided. Age and cumulative dose administered were recoded in categorical variables in this analysis.

Moreover, to evaluate each pretherapeutic variable as a predictive factor of toxic side effects, we determined the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of variants. First, to check that the tests ordered the patients in true positive, true negative, wrong positive, and wrong negative, we crossed the tests and calculated the κ concordance coefficient.

Sensitivity was calculated as follows: number of true positive patients/number of true positive + wrong negative patients.

Specificity was calculated as follows: number of true-negative patients/number of true negative + false-positive patients.

Statistical Package for the Social Sciences 13.0 and 10.0 for Windows (SPSS, Inc.) were used for statistical analyses.

Results

First study. Ten initial patients treated for metastatic colorectal cancer were studied. Their mean age was 60 ± 7 years. They were followed for 3.7 cycles (1-6 cycles).

As shown on Table 2, we found no difference in cation concentrations in plasma after oxaliplatin administration compared with baseline levels. We did not do oxalate measurement in plasma. In urine, we observed a significant increase of oxalate excretion within 5 h following oxaliplatin infusion, way over baseline levels (Table 2). These returned to the baseline levels on days 8 and 15. Table 2 also shows an increase of cation excretions (calcium, sodium, and potassium) 5 h after oxaliplatin administration followed by a decrease on day 8 for some patients and a return to the baseline level on day 15.

In fact, oxalate concentrations in urine did not display the same evolution for these 10 patients. For 3 of them, it remained stable, whereas for the others it increased up to a factor of 10. The urine excretion of calcium and magnesium closely followed that of oxalate.

The infusion of sodium chloride with oxaliplatin does not explain the elevation of cation levels in urine.

Chromatograms of the amino acids in urine were done before and after oxaliplatin infusion. Table 2 shows the concentrations of 4 amino acids out of the 20 main ones, which displayed modifications of concentrations in urine after oxaliplatin infusion: glycine, alanine, serine, and taurine. Interestingly, they are linked to the metabolism of glyoxylate, especially via the AGT enzyme. We observed a significant augmentation of their concentrations in urine, but for two patients, they remained stable, whereas for the eight other patients the increase could be up to 4-fold. This increase was accompanied by the simultaneous increase of urinary excretion of oxalate, calcium, and magnesium. However, we investigated too few patients to look for a correlation with neurologic symptoms.

Second study. We investigated a total of 135 patients in a prospective study: 93 men and 42 women. Their characteristics are displayed in Table 3.

Toxicity evaluation. Seventeen patients experienced severe neutropenia, 13 grade 3, and 4 grade 4. Ten patients had grade 3 diarrhea. One patient presented an allergic shock at the beginning of the fifth oxaliplatin infusion.

Neurologic toxicity has been especially characterized, evaluated, and graded, with its two types, acute and chronic, being identified.

Eighty-four patients experienced acute neurotoxic effects within NCI-CTC grades and 25 of them experienced grade 2 or 3 neurotoxicity. Twenty-six patients suffered from chronic neuropathy and 24 of them had grade 2 or 3 neurotoxicity (Table 3). If we look more precisely at the grade of neurotoxicity, 19 patients had grade 2 and 6 had grade 3 acute toxicity compared with 13 and 11 who had grade 2 and 3 chronic neurotoxicity, respectively (Table 3). Sixty-eight patients presented only distal neurotoxic effects, whereas 9 had also dysesthesia and/or paresthesia of the perioral and oral region, 7 had pharyngolaryngeal tract dysesthesia, and 6 had trismus for several days.

Genotyping results. About the *GRHR* gene, no variant was found (Table 4). In the *AGXT* gene, we only found the common polymorphism (Table 4) composed of the three variants that constitute the haplotype "minor allele": the 154C>T substitution, the duplication of 74 bp located on exon 1, and the 1142A>G substitution on the exon 10. In our population of patients, almost all the patients with the variant 154C>T, except three, presented both 74-bp duplication and 1142A>G (Table 4, bottom).

The frequency of their combination was 31.5%, which is higher than the 20% previously reported in the literature in a Caucasian population (Table 4; refs. 18, 19).

Usually, the minor allele is considered as present if at least two variants are found out of the three. We found 26.8% heterozygotes and 4.7% homozygotes; this agrees with previous results (~4% homozygotes).

We investigated *GST* polymorphism too. We found 64 *GST1A* patients, 14 *GST1B* patients, 1 *GST1C* patient, no *GST1D* patient, and 71 heterozygote patients.

About *MRP2*, we looked for *MRP2* 24C>T and 3972C>T variants. Seventy-four, 51, and 10 patients were wild-type homozygotes, heterozygotes, and variant homozygotes, respectively, for 24C>T polymorphism. Forty-seven, 58, and 30 patients were wild-type homozygotes, heterozygotes, and variant homozygotes, respectively, for 3972C>T polymorphism.

Table 2. In 10 patients over 37 cycle: plasma and urinary concentrations before oxaliplatin (H0), 2 and 5 h (H2, H5), and days 8 and 15 following oxaliplatin infusion (variation of amino acids in urine just before and after oxaliplatin infusion)

	n	D1 H0	D1 H2	D1 H5	D8	D15
Plasma concentration						
Calcium (mmol/L)	37	2.28 ± 0.09	2.31 ± 0.1	2.3 ± 0.09	2.28 ± 0.09	2.27 ± 0.08
t test				NS		
Magnesium (mmol/L)	37	0.79 ± 0.07	0.81 ± 0.12	0.76 ± 0.07	0.8 ± 0.08	0.76 ± 0.11
t test				NS		
Potassium (mmol/L)	37	3.68 ± 0.29	3.77 ± 0.34	3.79 ± 0.4	3.67 ± 0.38	3.47 ± 0.37
t test				NS		
Concentration in urine/creatinine						
Oxalate (μmol/mmol)	31	18.6 ± 13.88		54.5 ± 50.5 ↑ × 2.9	10.1 ± 8.1 ↓ × 1.8	15.8 ± 14.5
t test				P = 0.006		
Calcium (mmol/mmol)	36	0.34 ± 0.22		0.63 ± 0.34 ↑ × 1.8	0.3 ± 0.23 ↓ × 1.1	0.32 ± 0.19
t test				P = 0.003		
Magnesium (mmol/mmol)	32	0.23 ± 0.15		0.39 ± 0.28 ↑ × 1.65	0.21 ± 0.12	0.19 ± 0.13
t test				P = 0.009		
Potassium (mmol/mmol)	36	5.96 ± 2.26		10.16 ± 4.25 ↑ × 1.7	5.29 ± 1.71 ↓ × 1.2	4.97 ± 1.89
t test				P = 0.003		
Sodium (mmol/mmol)	36	16.09 ± 7.46		22.97 ± 12.1 ↑ × 1.42	10.0 ± 7.1 ↓ × 1.6	12.3 ± 5.62 ↓ × 1.3
t test				P = 0.001		
Amino acids						
Glycine	1	118.66 ± 34	Mean (μmol/mmol creatinine) ± SE		131.5 ± 83	143.3 ± 10
Comparison H0-H5			239.6 ± 139			
Alanine	1	26.2 ± 8	Nonparametric test: P = 0.047		35.7 ± 6	31.3 ± 7
Comparison H0-H5			50.7 ± 22.2			
Serine	1	19.3 ± 6	Nonparametric test: P = 0.03		23 ± 12	20 ± 2
Comparison H0-H5			29 ± 12			
Taurine	1	168.5 ± 69	Nonparametric test: P = 0.09		111 ± 32	152 ± 50
Comparison H0-H5			244 ± 87			
			Nonparametric test: P = 0.04			

NOTE: In 10 patients over 37 cycle: mean ± SD calcium, magnesium, and potassium plasma concentrations; mean ± SD oxalate, calcium, magnesium, potassium, and sodium urinary concentrations weighed by concomitant concentrations of creatinine before oxaliplatin (H0), 2 and 5 h (H2, H5), and days 8 and 15 following oxaliplatin infusion (normal oxalate concentrations in urine at baseline: 25.3 ± 11.5 μmol/mmol creatinine in urine); variation of amino acids in urine just before and after oxaliplatin infusion (H0, H5, day 8, and day 15).
Abbreviations: NS, not significant; ↑ ×, baseline value multiplied by...; ↓ ×, baseline value divided by...

Relationship between demographic characteristics, genetic polymorphism, and neurotoxicity. We looked for clinical and biological predictive factors of neurotoxicity. The influence of the main demographic characteristics on the variable of interest, neurotoxicity, was examined. There was neither significant association between age ($P = 0.059$, one-way ANOVA) nor between gender ($P = 0.404$, Fisher's exact test; grades 0 and 1 versus grades 2 and 3) and neurotoxicity (Table 5A). The other factor of interest in study was the administered dose. We compared the means of cumulative dose administered in different groups of neurotoxicity (grades 0, 1, 2, and 4) and found statistically significant differences ($P = 0.001$, one-way ANOVA; Table 5A).

The pharmacogenetic approach consisted in seeking two polymorphisms of the genes of the main enzymes responsible of oxalate catabolism. We looked for a relationship between AGXT, GSTπ, and MRP2 genotype and neurotoxicity. AGXT relevant variants were the 154C>T and 1142A>G genotypes. In this population, the frequencies of the C/C allele, C/T allele, and T/T allele were 69.4%, 25.8%, and 4.8%, respectively. There were 69.9% with the wild-type (A/A), 25.3% of heterozygous (A/G), and 4.8% of homozygous (G/G) variant

genotypes. It was hypothesized that the presence of mutations on these genes increased the risk of oxaliplatin-induced toxicity. About AGXT, we found that patients with the minor allele AGXT haplotype had a significantly higher risk of acute neurotoxicity. Only 4 patients of 92 (4.3%) who presented the major haplotype, the wild-type, had acute neurotoxicity at grade 2 or 3 compared with 23 of the 43 (53.4%) patients who had the minor haplotype.

On the other hand, 87.2% of subjects who had not any neurotoxicity (grade 0) were from wild-type (C/C) group; this percentage was 10.6% for patients with (C/T) genotype and 2.1% for those with the (T/T) variant genotype. In contrast, no patient was wild-type out of those who had severe neurotoxicity (grade 3), but 83.3% in this group had the heterozygous (C/T) variant genotype and they were 16.7% with the homozygous (T/T).

Interestingly, of seven homozygote variant patients, four presented severe neurotoxicity. Of the three other ones, two had initial reduced oxaliplatin doses and the third one had to have his treatment stopped after 2 months because of a grade 4 leucopenia.

These results concluded to very statistically significant relationships between neurotoxicity and 1142A>G and

Table 3. Clinical characteristics of the patients and distribution of acute and chronic neurotoxicity

No. patients	Total	135
	Women	42
Age	Men	93
	Mean	62 ± 11
Performance status	Range	30-80
	0	101
Primary tumor	1	30
	2	4
	Colon	83
Oxaliplatin	Rectum	52
	Dose/cycle	
Treatment (mo)	85 mg/m ² /15 d	121
	Mean	5 ± 2.85
	Range	3-25
Oxaliplatin cumulative dose (mg/m ²)	Mean	720 ± 267
	Range	255-2,125
Acute neurotoxicity, NCI-CTC (n)	Grade 0	50
	Grade 1	58
	Grade 2	20
	Grade 3	7
Chronic neurotoxicity, NCI-CTC (n)	Grade 0	105
	Grade 1	2
	Grade 2	15
	Grade 3	13

154C>T genotypes ($\chi^2 = 39.33, P < 0.001, C/C$ versus $C/T + T/T$; $\chi^2 = 38.88, P < 0.001, A/A$ versus $A/G + G/G$; Table 5B).

We found equivalent results with 1142A>G genotype (Table 5B). Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of the detection of the minor haplotype as predictive factors for acute neurotoxicity were 0.83, 0.84, 0.53, and 0.95, respectively.

Because both genotypes 1142A>G and 154C>T were associated to neurotoxicity, multivariable logistic regression analysis was done to report the specific information of each covariable on the outcome variable, neurotoxicity. The covariables included in the final model were the 154C>T genotype and the cumulative dose. The results showed that 60.7% of the variations were explained and 91% individuals were correctly classed by the model.

It is noteworthy that we found an identical relationship between minor haplotype and chronic neurotoxicity. Only 5 patients of 92 with the major haplotype experienced a chronic neurotoxicity compared with 23 of 43 with the minor haplotype. Again, the difference was highly significant.

We looked at GST π and MRP2 polymorphisms and found no correlation between their variants and neurotoxicity, either acute or chronic ($P < 0.410$; Table 5B).

Discussion

According to the objectives of the study, we were able to confirm the biological importance of oxalate production from oxaliplatin, and to determine relevant predictive factors of neurotoxicity, based on the exploration of the oxalate outcome pathway.

Indeed, oxaliplatin has a unique profile of induced neurotoxicity, with two distinct types, acute and chronic, whose relationship remains unclear to date. These very peculiar characteristics of the acute neurotoxic effects of oxaliplatin previously led us to suspect the implication of ionic channels.

Both our team and another one reported with different models its functional effects on sodium channel functions (6, 7). Furthermore, we showed with an electrophysiologic approach that one of its two metabolites, the oxalate, a calcium chelator, was clearly involved and had a deleterious effect on specific sodium neuron channels, voltage gated, and calcium dependent (6). We showed at the same time that DACH platin, the other oxaliplatin metabolite, had no effect on the ionic channels (6). Additionally, according to our hypothesis on oxalate involvement, we reported the interest of calcium gluconate and magnesium sulfate infusions to prevent oxaliplatin neurotoxicity in both its acute and chronic manifestations (9). Calcium and magnesium significantly reduced the incidence of neurotoxic effects, principally that of the acute ones.

Besides, some authors hypothesized a neurotoxic mechanism similar to that of cisplatin due to the accumulation of DACH platin in neurons and its effect on their trophicity (29). This hypothesis has never been confirmed. Actually, little is known about the molecular mechanisms of cisplatin neurotoxicity itself. Mollman (30) suggested that axonal transport may be involved, as the neurotoxicity progresses for weeks after treatment is stopped. More recently, it has been suggested that cisplatin may damage dorsal root ganglion neurons, containing the cell bodies of sensory neurons, shown to be the most vulnerable structure, by inducing apoptosis, based on *in vitro* and *in vivo* experiments in the rat (31, 32). Although it is hardly surprising that neurotoxic injury to the nervous system ultimately produces neuronal degeneration and cell death, the triggering mechanisms remain to be elucidated.

These two hypotheses of neurotoxicity generated two kinds of approaches for treating or preventing neurotoxicity. Certain authors tested unsuccessfully glutathione, amifostine, or α -lipoic acid, increasing the pathway of heavy metal detoxication (33–35). The last attempt with xaliproden did not provide convincing results (36). The other approach was to block the action of oxaliplatin on sodium channels with carbamazepine or gabapentin or to chelate oxalate by i.v. infusions of calcium and magnesium, the latter now being widely used in clinical practice (9, 37, 38).

In the present study, we further investigated the “track” of oxalate. We showed that its concentrations in urine could be considerably increased, up to 10-fold, after oxaliplatin administration and that it was accompanied by elevated calcium, magnesium, and sodium urinary excretions. This was also coupled to modifications of the urinary excretion of four amino acids: glycine, alanine, serine, and taurine. The analysis of the amino acid chromatograms in urine suggested an interaction between oxalate and amino acids, with a global profile showing a simultaneous increase, but at variable degrees, of their concentrations. All of them are closely linked to each other as well as with oxalate and glyoxylate metabolisms: glycine comes from glyoxylate by AGT; alanine and serine, as amine group providers, are both substrates and products of AGT; and taurine is closely linked to serine (39).

These results confirm that, after oxaliplatin administration, the liberation of oxalate is not negligible because it can be measured in urine and provokes a cascade of enzyme reactions of the glyoxylate metabolism and also modifications of urinary excretions of certain amino acids linked to it.

Therefore, our hypothesis is that, after a quick oxaliplatin infusion, the important and brutal afflux of oxalate would

result, due to the mass action law, in the production of glyoxylate by lactate dehydrogenase. AGT would induce glycine formation and consequently the transfer of the amine group. This could explain the concomitant variations of alanine, serine, and taurine.

We observed wide individual variability in the management of the rapid liberation of oxalate because after oxaliplatin the range of increase of oxalate in urine was considerable from 1- to 10-fold. The profile of calcium and magnesium in urine was closely linked as well as those of the four amino acids involved in the oxalate-glyoxylate metabolism. These results suggest that some patients were able to quickly metabolize oxalate through AGT and GRHPR, whereas other patients could not and consequently had a major increase of urinary excretion of oxalate.

We therefore looked for polymorphisms of the genes coding for the two major enzymes involved in oxalate outcome, AGT and GRHPR, and their eventual effect on oxalate management. We used the pyrosequencing method for its reliability and accuracy and because it is suitable for clinical practice, requiring 500 µL of total blood to extract DNA for genotyping (40).

In the population of 135 patients, thanks to the calcium and magnesium infusions, acute neurotoxicity frequency was lowered: 20 patients experienced grade 2 and 7 patients had grade 3 neurotoxicity. Chronic neurotoxicity was also reduced but at a lesser extent. About the genotyping study, we found no variant of the *GRHPR* gene in our population of 135 patients but we did find major and minor haplotypes of *AGXT*: the

154C>T substitution, the duplication of 74 bp located on exon 1, and the 1142A>G substitution on the exon 10 (15, 17).

Almost 32% of our population of patients presented the minor haplotype, with 4.7% being homozygotes (17, 18). According to the literature, out of the minor haplotype, the variant 154C>T (Pro11Leu) located on exon 1 plays a major role in the reduction of AGT activity, being ~30% less than its baseline due to a location error of the enzyme in the mitochondria rather than in the peroxisomes (18).

Patients with the minor allele *AGXT* haplotype were at significantly higher risk of acute neurotoxicity, 53.4% versus 4.3%, despite calcium and magnesium infusions. Moreover, of seven homozygote variant patients, four presented severe neurotoxicity, and of the three others, two had reduced cumulative dose of oxaliplatin. Interestingly, we found that minor haplotype cases were similarly linked to chronic neurotoxicity: 52% versus 5.5%. This result clearly favors a common mechanism in the genesis of acute and chronic neurotoxicity.

Besides the involvement of oxalate in the genesis of neurotoxicity, we explored the alternative hypothesis of a cumulative cisplatin-like toxicity, implying a detoxifying process, such as GSTπ or MRP2. We investigated their polymorphisms, already reported by different authors, with contradictory results (10, 11, 20). About GSTπ, we found frequencies close to those reported in the literature, but we found no correlation between any haplotype and neurotoxicity, neither acute nor chronic. Our results differ from those of

Table 4. Results of the detection of the variants of *AGXT* and *GRHPR* genes in 135 patients and frequency of *AGXT* minor haplotype

Variant	Amino acids	No. patients	Variant	Amino acids	No. patients
<i>GRHPR</i>			<i>AGXT</i>		
103Gdel (codon 35)	45LeuStop	0	154C>T	11Pr>Leu	45 (30%)
			155 C del	Codon 45 stop	0
			156Cins	Codon 167 stop	0
295C>T	99ArgStop	0	Duplication 74 bp intron 1		46 (30%)
[AAGT]del	Splicing error (codon 135 stop)	0	576T>A	152Phe>Ile	0
			588G>A	156Gly>Arg	0
			630G>A	170Gly>Arg	0
494G>A	165Gly>Asp	0	640G>A	173Cys>Tyr	0
			819C>T	233Arg>Cys	0
			820G>A	233Arg>His	0
			853T>C	244Ile>Thr	0
G/A intron G	Deletion exon 8	0	860G>A	246TrpStop	0
			A1119T	Arg333Stop	0
965T>G	Met322Arg	0	A1142G	Ile340Met	44 (30%)
154C>T 1142A> genotype			No. patients		%
CC AA (major haplotype)			102		68.5
CC AG (H)			1		0.6
CT AA (H)			2		1.3
CT AG (H)			36		24.2
CT GG (H)			1		0.6
TT AG (M)			1		0.6
TT GG (M)			6		4
Minor haplotype			47		31.5

NOTE: The genotype of the duplication of intron 1 is in brackets.
Abbreviations: W, wild-type; H, heterozygote; M, variant homozygote.

Table 5. Correlation study

A. Correlation between clinical and genetic variables and grade of neurotoxicity					
Variable	Neurotoxicity crossed with the other variables of interest				
	Neurotoxicity grade NCI				P
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
No. subjects (%)	47	54	18	6	
Age	64.9 ± 9.8	61.13 ± 9.4	60.3 ± 11.1	54.8 ± 16.1	0.059*
Body surface	1.74 ± 0.16	1.72 ± 0.19	1.78 ± 0.18	1.87 ± 0.18	0.18*
Dose of oxaliplatin	875 ± 479	1073 ± 435	1262 ± 394	1514 ± 482	0.001*
Gender					
Men	34 (72.3%)	34 (63%)	9 (50%)	5 (83.3%)	0.404 †
Women	13 (27.7%)	20 (37%)	9 (50%)	1 (16.7%)	
C154T genotype					
C/C	41 (87.2%)	42 (77.8%)	4 (22.2%)	0 (0%)	<0.001 †
C/T/T	6 (10.6%)	12 (18.5%)	14 (61.1%)	6 (83.3%)	
A1142G genotype					
A/A	42 (89.4%)	41 (77.4%)	4 (23.5%)	0 (0%)	<0.001 †
A/G-G/G	5 (10.6%)	12 (22.6%)	13 (66.5%)	6 (100%)	
B. Correlation study between AGXT and GSTπ haplotypes and 24C>T and 3972C>T MRP2 variants and neurotoxicity					
Polymorphism	No. patients	Acute neurotoxicity		Chronic neurotoxicity	
		Grade 0-1	Grade 2-3	Grade 0-1	Grade 2-3
Total	135	108 (80%)	27 (20%)	107 (79%)	28 (31%)
AGXT					
Major haplotype	92	88 (95.7%)	4 (4.3%)	87 (94.5%)	5.5 (5%)
Minor haplotype (heterozygous)	36	17 (47%)	19 (53%)	17 (47%)	19 (53%)
Minor haplotype (homozygous)	7	3 (43%)	4 (57%)	3 (43%)	4 (57%)
GSTπ haplotype (313A>G, 341C>T)	122				
A/A C/C	54	46 (85.2%)	8 (14.8%)	44 (81.7%)	10 (18.5%)
A/G C/C	42	33 (78.5%)	9 (21.5%)	35 (83.3%)	7 (17.1%)
A/G C/T	14	12 (85.7%)	2 (14.3%)	12 (85.7%)	2 (14.3%)
G/G C/C	9	6 (66.6%)	3 (33.3%)	6 (66.6%)	3 (33.3%)
G/G C/T	2	2 (100%)	0	2	0
G/G T/T	1	1 (100%)	0	1	0
MRP2	135				
24C>T					
CC	74	59 (80%)	15 (19.4%)	60 (81.2%)	14 (19%)
C/T	51	41 (82%)	10 (19.5%)	38 (74.5%)	13 (25.5%)
T/T	10	8 (80%)	2 (12.5%)	9 (90%)	1 (90%)
3972C>T					
CC	47	36 (77%)	11 (23%)	38 (81%)	9 (19%)
C/T	61	50 (82%)	11 (17.8%)	49 (80%)	12 (20%)
T/T	27	23 (85.2%)	4 (16%)	23 (85.2%)	4 (16%)
Annex 1. Nucleotide sequences of the primers used for the directed mutagenesis of 3 sites of AGXT (mutated bases in bold)					
Primer	Nucleotide sequence 5'-3'				
Variant Phe152Ile (T/A) + Gly156Arg (G/A)					
Sense	AGTGCTGCTGATCTTAACCCACAGGGAGTCGTCC				
Antisense	GGACGACTCCCTGTGGTTAAGATCAGCAGCACT				
Variant Gly170Arg (G/A)					
Sense	CCCTTGATGGCTTCAGGGAACCTCGCCACA				
Antisense	TGTGGCAGAGTCCCTGAAGCCATCAAGGG				
Exon 4 cloning primers					
Sense	GTTTGTGGGGGTGTTCTG				
Antisense	AGGACCAGAGGGACCACT				
NOTE: AGXT: P < 0.001, χ ² test, Fisher's exact test.					
*One-way ANOVA.					
† χ ² test, Fisher's exact test.					

Lecomte et al. and Grothey et al. who reported in a smaller population a correlation between the two variants and the incidence of chronic and acute neurotoxicity, respectively (10, 11). However, previous results are not in favor of a

cisplatin-like mechanism of toxicity. Unlike cisplatin, sural nerve biopsy studies on patients having received few cycles of oxaliplatin and displaying neuropathic symptoms had shown no signs or only minor morphologic signs of axonal

degeneration, which could hardly be distinguished from normal findings and which contrasted with the intensity of subjective symptoms. Thus, oxaliplatin is likely to have a direct pharmacologic effect on the excitability of sensory neurons and possibly muscle cells that has not been previously described with other platinum agents. Besides, certain authors showed that DACH platin, the other metabolite of oxaliplatin, was not involved in neurotoxicity (41), and Takimoto et al. (42) reported that oxaliplatin neurotoxicity was neither correlated to creatinine nor to ultrafilterable platinum clearances and was not linked to an accumulation of platinum. Thus, functional neuronal damage produced by oxaliplatin may result in part from the effects of this drug on voltage-gated sodium channels and chronic oxaliplatin-induced neuropathy could be the long-term consequence of its acute toxicity. On the other hand, cisplatin-induced neuropathy is classically reported as a very long-term platinum retention in deep compartments, such as neuronal tissue, and to progressive accumulation (41), whereas oxaliplatin has a completely different pharmacokinetic profile and does not accumulate in plasma, with repeated chemotherapy cycles (43).

About MRP2, previous data were very scarce. We looked for two single nucleotide polymorphisms, 24C>T and 3972C>T, and found that neurotoxicity, both acute and chronic types, was equally distributed in the different variants.

In total, it is likely that, in patients who displayed the AGXT minor haplotype, the major enzyme of glyoxylate and oxalate

metabolism has a partially reduced activity. These patients seem unable to cope with a brutal inflow of oxalate after oxaliplatin infusion, whose elimination becomes predominantly urinary. Its intracellular concentration increases and it interferes with sodium channels and generates acute neurotoxicity.

The disruption of ionic movements could hinder processes such as gene expression and lead to heterogeneous mRNA synthesis, intraneuronal heterogeneity of the populations of Na⁺ channels in cutaneous afferents, membrane instability, and possibly ectopic impulse generation, resulting in paresthesia, dysesthesia, and hyperesthesia (12). With repeated oxaliplatin infusions, oxalate could progressively affect neurotransmitter release, growth cone elongation, and neuron trophicity and thus could lead to chronic neurotoxicity. Indeed, this favors a common pathogeny of both acute and chronic neurotoxicity due to oxaliplatin.

These data support the future use of this genotyping approach, suitable to clinical practice, to be used as a screening test to identify patients at high risk of neurotoxicity before oxaliplatin-based therapy. This could help better prevent neuropathy by, for example, being more prudent in terms of cumulative oxaliplatin dosage in the case of a patient with the minor haplotype or by using higher doses or more prolonged calcium-magnesium administrations rather than carbamazepine, gabapentin, or venlafaxine, whose efficacy is not obvious and whose toxicity is a cause of concern.

References

- Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:11–2.
- Pendyala L, Creaven RJ, Perez R, Zdanowicz JR, Raghavan D. Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36:271–8.
- Wilson RH, Lohky T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 2002;20:1767–74.
- Yang CC, Liao SC, Deng JF. Tetrodotoxin poisoning in Taiwan: an analysis of poison center data. *Vet Human Toxicol* 1996;38:282–6.
- Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapiere B, Pelhate M, Gamelin E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 2001;85:2293–7.
- Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na⁺ channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 2000;406:25–32.
- Tobe TJ, Braam GB, Meulenbelt J, van Dijk GW. Ethylene glycol poisoning mimicking Snow White. *Lancet* 2002;359:444–5.
- Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 2002;29:21–33.
- Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4055–61.
- Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Loric M. Glutathione-S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;12:3050–6.
- Balayssac D, Cayre A, Authier N, et al. Involvement of the multidrug resistance transporters in cisplatin-induced neuropathy in rats. Comparison with the chronic constriction injury model and monoarthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2006;544:49–57.
- Rizzo M, Kocsis JD, Waxman SG. Mechanisms of paresthesiae, dysesthesiae, and hyperesthesiae: role of Na⁺ channel heterogeneity. *Eur Neurol* 1996;36:3–12.
- Hagler L, Herman RH. Oxalate metabolism. *Amer J Clin Nutr* 1973;26:1073–9.
- Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol* 1998;160:1617–24.
- Pirulli D, Marangella M, Amoroso A. Primary hyperoxaluria: genotype-phenotype correlation. *J Nephrol* 2003;16:297–309.
- Cochat P, Koch Nogueira PC, Mahmoud MA, Jamieson NV, Scheinman JL, Roland MO. Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical, and economic issues. *J Pediatr* 1999;135:746–50.
- Danpure CJ. The molecular basis of alanine:glyoxylate aminotransferase mistargeting: the most common single cause of primary hyperoxaluria type 1. *J Nephrol* 1998;11:8–12.
- Purdue PE, Lumb MJ, Allsop J, Danpure CJ. An intronic duplication in the alanine:glyoxylate aminotransferase gene facilitates identification of mutations in compound heterozygote patients with primary hyperoxaluria type 1. *Hum Genet* 1991;87:394–6.
- Webster KE, Cramer SD. Genetic basis of primary hyperoxaluria type II. *Mol Urol* 2000;4:355–64.
- DeJong FA, Scott-Horton TJ, Kroetz DL, et al. Irinotecan-induced diarrhoea: functional significance of the polymorphic ABC2 transporter protein. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:42–9.
- de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938–47.
- Gamelin E, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 1998;16:1470–8.
- Gamelin E, Boisdron-Celle M, Turcant A, Allain P, Robert J. Rapid and sensitive HPLC analysis of halogenopyrimidines in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;695:409–16.
- Levi F, Perpoint B, Garufi C, et al. Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur J Cancer* 1993;29:1280–4.
- Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ. Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol* 1990;111:2341–51.
- Cregeen DP, Williams EL, Hulton S, Rumsby G. Molecular analysis of the glyoxylate reductase (GRHPR) gene and description of mutations underlying primary hyperoxaluria type 2. *Hum Mutat* 2003;22:497.
- Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphism by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* 2000;10:1249–58.
- Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11:3–11.
- Extra JM, Marty M, Brienza S, Missel JL. Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 1998;25:13–22.
- Mollman JE. Cisplatin neurotoxicity. *N Engl J Med* 1990;322:126–7.
- Gill JS, Windebank AJ. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 1998;101:2842–50.
- McDonald ES, Windebank AJ. Mechanisms of neurotoxic cell injury and cell death. *Neuro Clin* 2000;18:525–40.
- Cascinu S, Catalano V, Cordella L, et al. Neuroprotective effect of reduced glutathione

Imaging, Diagnosis, Prognosis

- on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2002;20:3478–83.
34. Penz M, Kornek GV, Raderer M, Ulrich-Pur H, Fiebigler W, Scheithauer W. Subcutaneous administration of amifostine: a promising therapeutic option in patients with oxaliplatin-related peripheral sensitive neuropathy. *Ann Oncol* 2001;12:421–2.
35. Gedlicka C, Scheithauer W, Schull B, Kornek GV. Effective treatment of oxaliplatin-induced cumulative polyneuropathy with α -lipoic acid. *J Clin Oncol* 2002;20:3359–61.
36. Susman E. Xaliproden lessens oxaliplatin-mediated neuropathy. *Lancet Oncol* 2006;7:288.
37. Lersch C, Schmelz R, Eckel F, et al. Prevention of oxaliplatin-induced peripheral sensory neurotoxicity by carbamazepine. *J Clin Oncol* 2002;7:1767–74.
38. Wilson RH, Lehty T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 2002;7:1767–74.
39. Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol* 1998;160:1617–20.
40. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2895–904.
41. Shord SS, Beranrd SA, Lindley C, et al. Oxaliplatin biotransformation and pharmacokinetics: a pilot study to determine the possible relationship to neurotoxicity. *Anticancer Res* 2002;22:2301–9.
42. Takimoto CH, Remick SC, Sharma S, et al. Dose-escalating and pharmacological study of oxaliplatin in adult cancer patients with impaired renal function: a National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group Study. *J Clin Oncol* 2003;21:2664–72.
43. Gamelin E, Le Bouil A, Boisdron-Celle M, et al. Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil to colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 1997;3:891–900.

IV. DISCUSSION GENERALE et CONCLUSION

Avec plus de 38 000 nouveaux cas diagnostiqués annuellement, le cancer colorectal représente un véritable défi en terme de Santé Publique dans notre pays d'autant qu'environ 50% des malades présentent ou présenteront au cours de l'histoire de leur maladie une évolution métastatique grévée d'une importante mortalité avec moins de 10 % des patients encore vivants à 5 ans.

La fréquence de cette maladie, très clairement liée à l'âge avec une incidence exponentiellement croissante à partir de 50 ans justifie des efforts de prévention, de dépistage et finalement d'optimisation des thérapeutiques disponibles, afin d'offrir au plus grand nombre les meilleures options thérapeutiques et notamment les options de résections radiochirurgicales, dans une optique de possible guérison.

Malgré les progrès accomplis depuis plus de 30 ans (les soins de support étaient encore le standard de traitement en situation métastatique au début des années 90), la médiane de survie globale n'est que d'environ 2 ans à l'heure actuelle et aux stades avancés alors même que de façon parallèle l'arsenal thérapeutique s'est enrichi. Au-delà de la « pierre angulaire » du traitement qu'est le 5-Fluorouracile, de nouvelles molécules sont apparues, cytotoxiques classiques comme l'oxaliplatine ou l'irinotecan, et thérapies dites « ciblées » dirigées contre les mécanismes de néoangiogenèse tumorale (Bevacizumab, anticorps antiangiogénique ciblant le VEGF) ou encore visant les voies de transduction des signaux notamment la voie MAP kinase et PI3 Kinase, activées par la stimulation du récepteur membranaire de l'EGF (Cetuximab et Panitumumab).

Outre l'intérêt de la prophylaxie primaire imposant des changements de modes de vie alimentaire (diminution des apports caloriques) comme sédentaire (pratique du sport), et la généralisation sur tout le territoire de campagnes de dépistages, qu'ils soient d'ordre individuel, imposé par un profil personnel ou familial à risque, ou d'ordre collectif (dépistage de masse), une meilleure rationalisation des soins est indispensable au contrôle de la maladie au stade précoce comme au stade tardif (**Figure 44**), d'autant que les considérations pharmaco-économiques se révèlent chaque jour plus pressantes. Le choix de traitements combinés à des formes orales, qui ont montré leur non infériorité par rapport à des schémas IV exclusifs et le développement des soins de support (G-CSF, traitements antalgiques, antiémétiques,..) participent également à cette rationalisation (maintien des doses-intensités,

confort de vie, gestion des effets secondaires) avec l'accent porté désormais très clairement sur le bien-être du patient et sur un meilleur vécu des traitements (**Figure 45**).

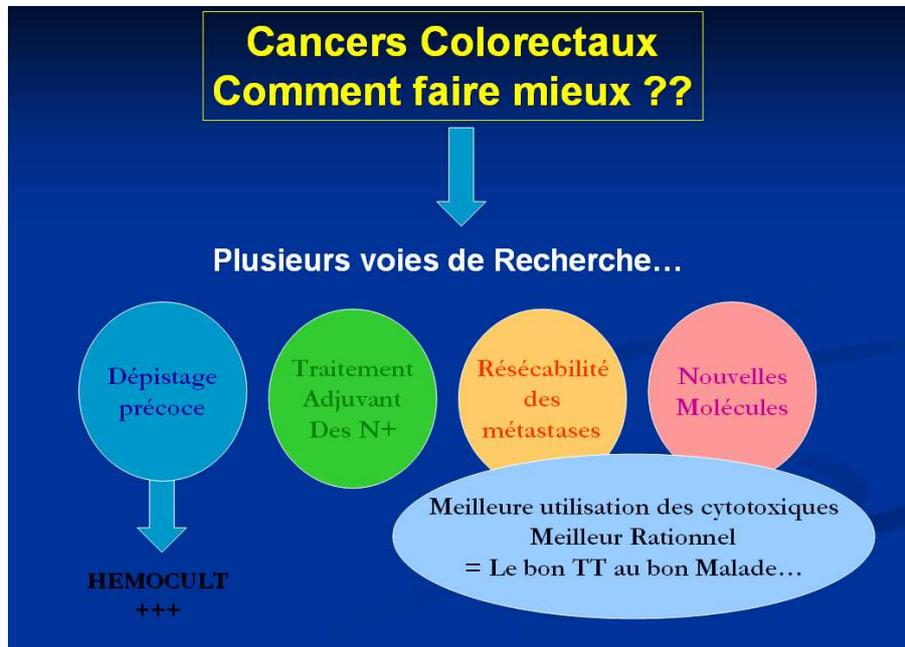


Figure 44. Les différentes voies d'optimisation visant à améliorer le pronostic global du cancer colorectal : dépistage de lésions précancéreuses et/ou aux stades très précoces, éradication des micrométastases par les traitements adjuvants, amélioration des techniques radiochirurgicales (traitements des métastases localisées), développement de nouvelles molécules actives et enfin meilleure optimisation des molécules déjà existantes.

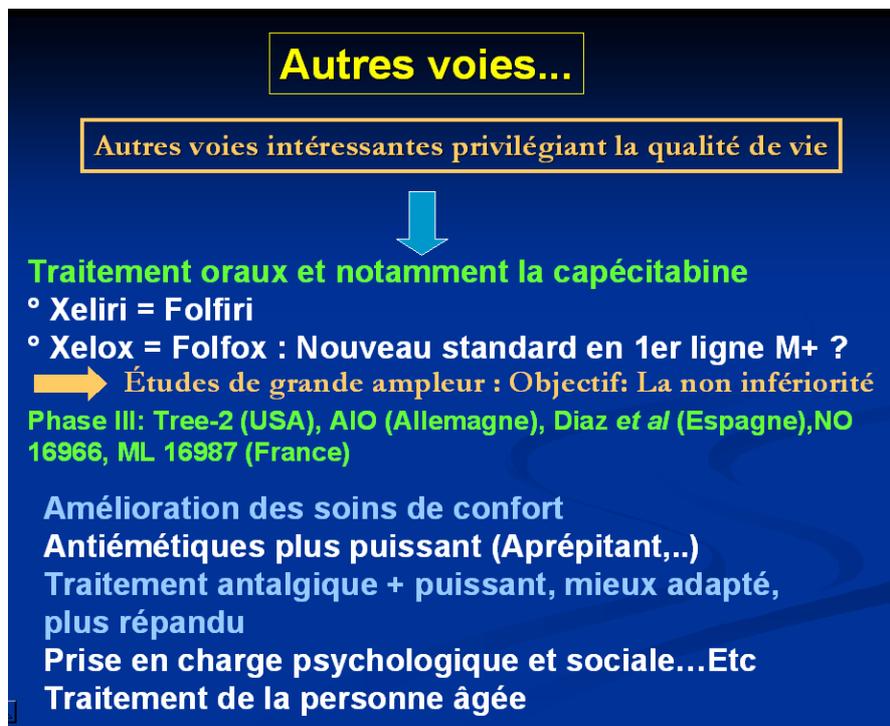


Figure 45. Les autres voies thérapeutiques privilégiant la qualité de vie.

Concernant spécifiquement l'optimisation des traitements de chimiothérapie existants, la pharmacogénétique comme la pharmacogénomique, parce que visant « *le bon traitement au bon malade et à la bonne dose* », et impactant ainsi sur la qualité de vie des malades (diminution des toxicités sévères) et sur leur pronostic global (amélioration des réponses/contrôle de la maladie), représentent des voies de recherche primordiales, dont la place (en terme de publications scientifiques comme en terme de pratique courante) ne fait et ne fera que croître dans les années qui viennent.

Pour mieux cerner l'intérêt potentiel de notre travail de Thèse d'Université détaillé dans ces pages sous forme de communications (articles et résumés/posters présentés en congrès), nous avons cherché à faire la démonstration par une revue la plus exhaustive et, on l'espère, la plus récente de la littérature, des enjeux de Santé Publique qu'implique la fréquence dans notre société des cancers en général et du cancer colorectal en particulier, ainsi que des modalités de son traitement. Dans ce but, nous nous sommes basés sur le rationnel historique et scientifique ayant amené aux progrès observés dans la gestion au quotidien de la maladie métastatique tant pour le malade que pour son praticien. Afin de comprendre l'objet de nos recherches - s'entend : le rôle des différentes enzymes et protéines impliquées dans le métabolisme des cytotoxiques étudiés dans nos études -, nous avons détaillé dans la deuxième partie de notre exposé les caractéristiques concernant la pharmacologie et la pharmacogénétique des trois principaux traitements cytotoxiques de chimiothérapie dans le cadre des cancers colorectaux : le 5-Fluorouracile, l'irinotecan et l'oxaliplatine.

Enfin nous avons présenté nos travaux en essayant de les mettre en perspective par rapport aux résultats déjà connus et publiés, poursuivant en cela les efforts entrepris depuis plusieurs années dans notre laboratoire sur cette thématique.

Finalemment, notre travail de Thèse s'est voulu résolument translationnel et appliqué, cherchant en permanence à intégrer le bénéfice direct pour le patient et visant à définir un schéma « simplifié », autant que possible (surtout dans ce domaine complexe enzymatique et biologique du métabolisme des drogues anticancéreuses), qui pourrait guider le praticien dans ses choix thérapeutiques.

Il ressort ainsi de notre expérience, scientifique et de praticien oncologue, que :

- ✓ Au vu des progrès réalisés en terme de résecabilité des métastases, le choix d'un traitement rapidement optimal doit être recherché à tout prix pour espérer

offrir des options de guérison potentielle à des patients sélectionnés et dont la maladie est localisée et accessible aux options de résection ; dans ce contexte, les traitements offrant les meilleurs taux de réponses doivent être privilégiés car ce sont ces taux qui sont les éléments majeurs du succès thérapeutique.

- ✓ Dans les situations adjuvantes et codifiées pour les stades III (pN+ à l'anatomopathologie sur la pièce opératoire), où 10 patients seront traités pour le bénéfice d'un seul, il est impératif de disposer de protocoles optimaux dans leur rapport toxicité/efficacité. Ceci est encore plus vrai dans les situations plus discutables (stade II) où près de 50 patients sont traités pour en sauver un.
- ✓ Dans les situations métastatiques définitivement irrésécables, la qualité de vie doit être privilégiée (et donc des schémas de moindre toxicité) ainsi que le contrôle des symptômes quand ils sont présents.
- ✓ Les produits de chimiothérapies classiques sont coûteux, *a fortiori* les thérapies ciblées, et non dénués d'effets secondaires : un meilleur rationnel est donc indispensable pour des raisons aussi bien économiques qu'éthiques.
- ✓ Contrairement à une idée reçue, les thérapies « ciblées » ne dérogent pas à la règle archaïque prévalant pour les chimiothérapies classiques : en dehors de cas caricaturaux comme les mutations de Kras qui excluent l'utilisation des anticorps anti EGFR, le choix entre une thérapie ciblée visant la néoangiogenèse (bevacizumab) et celle visant la transduction du signal médiée par les récepteurs EGF, ne se fait souvent que sur des critères subjectifs laissés à l'oncologue et aux habitudes de service, au même titre que le choix entre irinotecan et oxaliplatine en première ligne par exemple.
- ✓ Les doses de traitements sont toujours des doses moyennes adaptées secondairement à la toxicité en les réduisant au besoin, rarement en les augmentant en cas de bonne tolérance. Manifestement des patients, sous-dosés, sont considérés comme « échappant au traitement », alors qu'ils évoluent sous un régime insuffisamment adapté à leur métabolisme comme à celui de leur tumeur.

Dans ce contexte nous avons cherché à démontrer par nos études rapportées et discutées dans ces pages que :

- ✓ *L'on pouvait définir, et dans chaque situation de traitements, des groupes de patients à risques de toxicité et/ou de mauvais pronostic, et ce par l'analyse de polymorphismes sélectionnés sur ADN germinale, isolé à partir des leucocytes circulants d'un simple prélèvement sanguin. La technique est rapide (se calquant sur la nécessité de s'adapter aux contraintes imposées par la mise en route précoce d'un traitement spécifique sans perte de chance pour le malade), et de routine dans un laboratoire « expert »; il a par ailleurs été montré que, concernant les enzymes impliquées dans les métabolismes des agents anticancéreux, le taux de corrélation entre ADN germinale et ADN tumoral était relativement élevé [191-192], ce qui justifie de l'extension d'un rationnel initialement plutôt destiné à la recherche de facteurs prédictifs de toxicité, à un rationnel de corrélation avec la réponse prévisible au traitement sans nécessité d'exploration au niveau tumoral techniquement plus complexe.*

- ✓ *Sur le plan pharmacologique, l'approche combinée de détection préthérapeutique par des techniques phénotypiques (rapport UH2/U) et génotypiques (pyroséquençage) des mutations DPYD, secondairement suivie d'une adaptation pharmacocinétique de doses, permet d'excellents taux de réponses et de survies (supérieurs souvent aux résultats publiés dans la littérature pour des schémas équivalents), et ce tant pour le LV5FU2, que pour le FOLFOX4 ou le FOLFIRI, avec l'objectivation dans le même temps thérapeutique de toxicités très inférieures en nombre comme en intensité par rapport à ce qui est habituellement rapporté dans les publications. Ces constatations confirment donc l'intérêt de la démarche combinée pharmacocinétique/pharmacogénétique si elle était généralisée à l'ensemble des populations cibles et sur tout le territoire.*

- ✓ *Concernant spécifiquement le 5-FU, nous avons pu ainsi isoler une population présentant un mauvais pronostic sur la survie globale (3R/3R pour la TYMS et homozygote sauvage pour 1298 A>C ou 677 C>T de la MTHFR), dont la détermination pourrait conditionner les traitements tant en situation adjuvante que métastatique. La monochimiothérapie par 5-FU modulé par l'acide*

folinique peut en effet se révéler tout aussi efficace qu'un traitement combiné en situation métastatique tout en améliorant la qualité de vie. Par ailleurs les résultats obtenus avec les schémas séquentiels (CAIRO1, FOCUS et FFCO 2000-05 [167-169]) privilégiant en première intention l'utilisation d'une monothérapie jusqu'à progression, renforcent cette logique thérapeutique. L'intérêt de poursuivre les explorations concernant le 5-FU, à l'heure moderne des thérapies ciblées, reste donc tout à fait valable et non « désuet », ce d'autant que les combinaisons de traitements font systématiquement courir un risque de majoration des toxicités et que réduire ce risque au maximum doit toujours être la priorité.

- ✓ *Concernant l'irinotecan, un traitement « biologiquement » piloté par le statut de l'UGT 1A1 peut se révéler extrêmement efficace sans toxicité rédhibitoire avec des taux de réponses équivalents selon chaque sous-population étudiée (6/6, 6/7, 7/7), et donc sans perte de chance pour le malade : près de 71% de maladie stabilisée et en deuxième ligne métastatique, lorsqu'il est associé à un traitement anti-EGFR. Par ailleurs, l'irinotecan semble « annuler » les effets génotypiques des enzymes impliquées dans le métabolisme du 5-FU (notamment le statut TYMS) et donc « rattraper » en quelque sorte, une mauvaise réponse prévisible sous monochimiothérapie par l'antimétabolite, guidant les options thérapeutiques pour le praticien. De même l'existence de cet effet sur les corrélations possibles entre ce génotype TYMS au niveau germinale et les taux de réponses et de toxicités, doit faire considérer avec précaution les résultats de publications les rapportant en dehors d'une stricte monochimiothérapie par 5-Fluorouracile.*

- ✓ *Dans le cas d'un traitement combinant FOLFIRI intensifié et Cetuximab, l'analyse rétrospective des statuts Kras, Braf et PI3KCA des 54 patients (sur 104 de la cohorte initiale), dont le matériel tumoral a pu être analysé, retrouve les mêmes résultats en terme de fréquence des mutations Kras et Braf comme en terme de facteur prédictif de non-réponse à un traitement par anti-EGFR, que les données réactualisées de CRYSTAL et OPUS présentées au dernier congrès de l'ESMO 2009 et celles rapportées par Tejpar S *et al.* concernant le Consortium Européen. Notre étude retrouve cependant un taux bien plus élevé*

d'incidence des mutations au niveau des exons 9 et 20 de PI3KCA (38,9%) qu'habituellement rapporté dans la littérature. Le faible effectif de patients et la technique de biologie moléculaire (plutôt que protéomique) pourraient en partie expliquer ces résultats discordants. Enfin et contrairement au Consertium, ces mutations étaient très fortement corrélées à une survie sans progression plus courte qu'en leur absence et dans la population Map Kinase (Kras et Braf) sauvage : 2,8 versus 9,8 mois, $p=0,017$. Le rôle complexe du statut PI3KCA sur des combinaisons de traitement avec anti-EGFR ne permet donc pas, à l'heure actuelle, de tirer des conclusions définitives. En tout cas il ne justifie pas de l'abstention d'un traitement ciblé permettant, même dans ce cas mutationnel, d'obtenir des taux de réponse supérieurs à 20%. Il n'en demeure pas moins que cette voie transductionnelle fera l'objet à l'avenir de recherches dédiées dans les futurs essais, au même titre que d'autres potentiels candidats de biomarqueur prédictif : épiréguline, amphiréguline, IGF-1, polymorphismes des gènes EGFR et FC γ R.

- ✓ Considérant les voies de transduction du signal médiées par l'EGFR, le rôle justement de PI3K pourrait expliquer un phénomène paradoxal observé dans les essais cliniques. Ce phénomène paradoxal tout à fait intéressant pourrait faire intervenir les mécanismes sous-tendant les voies de réparation de l'ADN médié par le système NER, et notamment ERCC1 dont nous parlerons plus loin. Ainsi il est très clairement observé un effet délétère de l'adjonction d'un anticorps monoclonal anti-EGFR à une combinaison de chimiothérapie à base d'oxaliplatine dans les situations de mutations du gène Kras : essai OPUS [28] avec le cetuximab, et tout dernièrement (ESMO 2009), l'essai PRIME présenté par Douillard JY *et al.* (**Abstract 10LBA**). Cette étude de phase III, prospective, en ouvert, a randomisé 1183 patients présentant un cancer colorectal traité en première ligne par panitumumab + FOLFOX4 versus FOLFOX4. Outre le bénéfice attendu dans le bras expérimental et en cas d'absence de mutations Kras, il s'est avéré que le panitumumab était délétère chez les patients Kras mutés : la survie sans progression médiane dans ce cas était statistiquement inférieure comparé au groupe traité par FOLFOX4 seul (7,3 versus 8,8 mois ; HR 1,29, IC95% [1,04-1,62], $p=0,02$). De même pour la survie

globale (15,1 versus 18,7 mois, $p=0,004$). Or ce phénomène n'est pas observé ni en cas de traitement par antiangiogénique (+ oxaliplatine), ni en cas de traitement par irinotecan (+ anti-EGFR chez Kras mutés). Enfin, dernière observation : le statut Kras ne semble pas interférer avec l'efficacité ou la tolérance d'un traitement par FOLFOX ou FOLFIRI (**Voir page 190**). Le sujet peut paraître « dérisoire » - dans la mesure où le cetuximab comme le panitumumab ne sont plus indiqués à l'heure actuelle en cas de mutations Kras, le problème n'est donc plus « d'actualité », il n'en demeure pas moins qu'il peut aboutir au contraire à une meilleure rationalisation de l'oxaliplatine en cas de mutations de PI3KCA. Nous faisons en effet l'hypothèse que dans le cas d'une mutation de PI3KCA, quel que soit le statut Kras, (soit 36 % des patients dans notre sous-population de « *FOLFIRI intensifié + cetuximab* »), l'effet antitumoral de l'oxaliplatine pourrait être diminué par augmentation du taux basal intranucléaire de ERCC1, encore majoré par une stimulation de la voie des Map Kinases (via EGF ou encore les mutations constitutionnelles Kras). Si cette hypothèse se révélait exacte, le statut PI3KCA muté pourrait être considéré comme un facteur prédictif fort de mauvaise réponse à l'oxaliplatine et pourrait ainsi à l'avenir guider le choix entre ce cytotoxique et l'irinotecan, et ce sur des bases objectives. En fait le rationnel de notre hypothèse repose sur des travaux de recherche fondamentale. Tout d'abord, il a été clairement démontré *in vitro* sur cultures cellulaires que l'activation de Kras (ou une de ses isoformes) induisait une hyperexpression d'ERCC1 [193]. En second lieu, Kras a de multiples effecteurs en dehors de Braf, dont PI3K et sa sous-unité catalytique PI3KCA comme Repasky GA *et al.* le décrit dans une revue de novembre 2004 [194]. Le rôle d'une activation constitutionnelle de Kras sur PI3KCA est moins clair, mais la logique voudrait que cette activation accentue encore la stimulation basale. Enfin, et le plus important, des résultats *in vitro* sur cellules d'hépatocarcinome humain montrent clairement le rôle de la voie PI3K dans le contrôle du taux basal d'ERCC1 [195] ; une stimulation par la voie des Map kinases (Kras) ne pourra être efficiente si cette stimulation basale est inhibée. Nous faisons l'hypothèse que cette stimulation du taux basal d'ERCC1 doit être régulée par un

rétrocontrôle négatif, comme dans la plupart des systèmes métaboliques, et possiblement par ERCC1 lui-même. En cas de mutation constitutionnelle de PI3KCA, ce rétrocontrôle peut être perdu, accentuant les risques de résistance au traitement par oxaliplatine. Enfin en cas de mutation Kras et PI3KCA sauvage, l'inhibition de la voie PI3K par une thérapie ciblée anti-EGFR, devrait aboutir à une surstimulation de « rattrapage », via Kras, de PI3K (adaptation à « l'agression » par la thérapie ciblée) et donc d'ERCC1. Cette situation (2/3 des cas si mutation Kras dans notre série) pourrait expliquer l'effet délétère de l'adjonction d'un anti-EGFR au FOLFOX (**Figure 46**). Ces hypothèses seront explorées dans les prochains mois d'une part *sur le plan fondamental* (rétrocontrôle d'ERCC1) dans notre laboratoire INSERM, et d'autre part *sur le plan translationnel* par une analyse rétrospective des statuts Kras et PI3KCA au sein de notre cohorte de patients (celle des publications N°3 et 4) traités par FOLFOX4, analyse qui devrait bientôt débiter pour asseoir le rôle potentiellement négatif des mutations de PI3KCA sur un schéma à base d'oxaliplatine.

- ✓ *Concernant spécifiquement l'oxaliplatine justement, la neurotoxicité aigue serait liée à des désordres hydroélectrolytiques via les canaux sodiques calcium-dépendants impliquant l'oxalate et possiblement donc l'AGXT. La toxicité tardive impliquerait plutôt des lésions par adduits liés au dichloro-DACH platinum sur l'ADN des neurones sensitifs des ganglions spinaux périphériques, adduits favorisés par la défaillance des complexes de réparation du système NER. Ainsi les patients homozygotes T/T pour ERCC1 118 C>T et C/C XPD 751 A>C sont à risque de neurotoxicité mais tirent par contre profit de cette sensibilité accrue à l'oxaliplatine par une meilleure survie sans progression (10 mois environ versus 8 pour les autres groupes). Les populations homozygotes « sauvage » et hétérozygotes pour ces enzymes (C/C et C/T pour ERCC1 118 C>T, A/A et A/C pour XPD 751 A>C), pourraient à l'inverse bénéficier d'un traitement « intensifié » par oxaliplatine (100 mg/m² tous les 15 jours par exemple), bien qu'il n'y ait pas d'effet-dose cliniquement encore démontré à l'heure actuelle pour l'oxaliplatine [3] ; ceci dit la grande prévalence des neurotoxicités et leurs sévérités ont été des facteurs très largement limitatifs dans l'évaluation de*

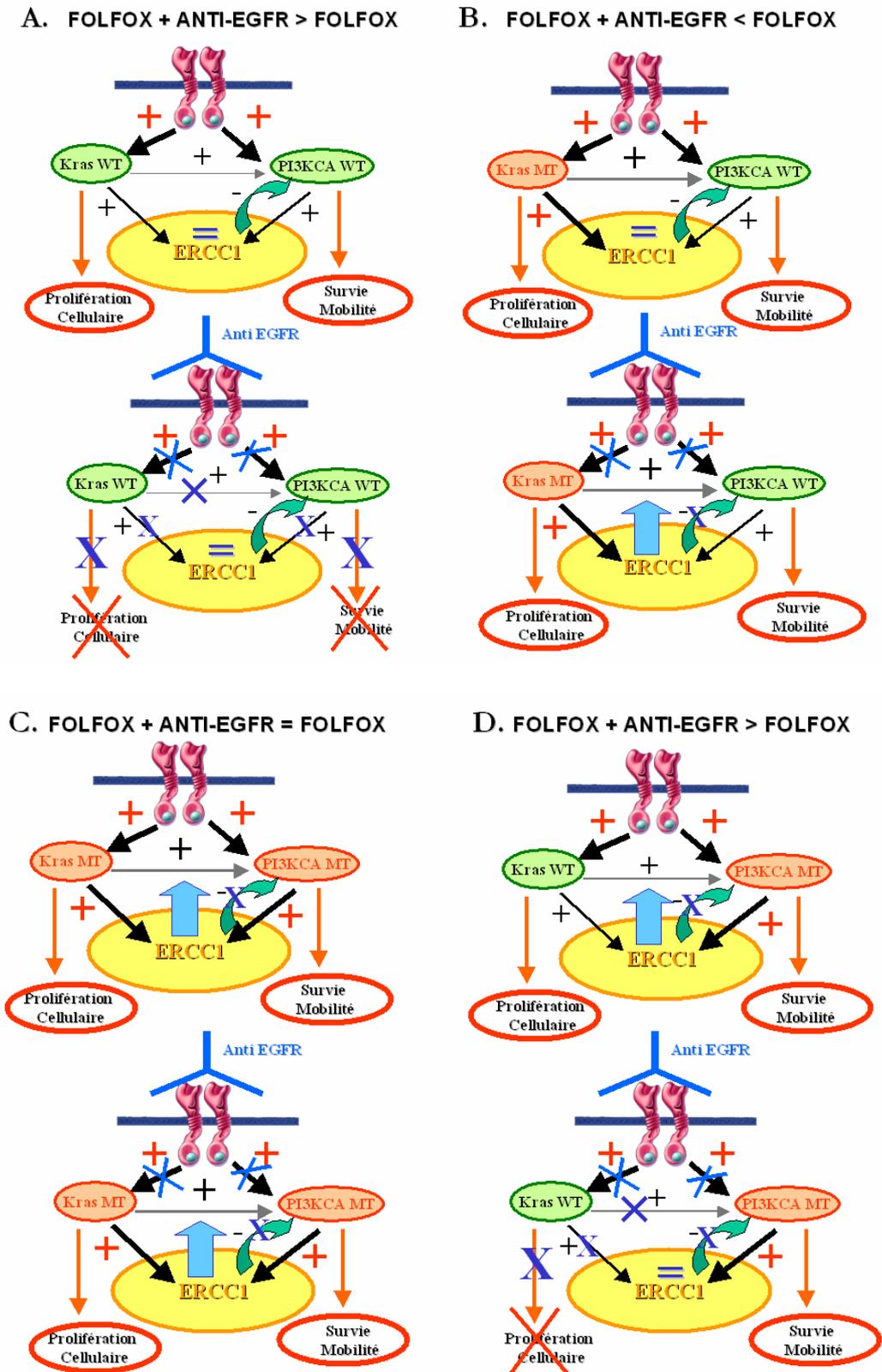


Figure 46. Les différentes situations Kras et PI3KCA en terme de mutations et retentissement sur l'expression d'ERCC1, selon l'adjonction ou non d'un traitement anti-EGFR.

ce concept dose-intensité ; la sélection des patients avec un profil « protecteur » pourrait justement reconsidérer de nouvelles modalités de délivrance de ce cytotoxique. Ainsi, *et à notre connaissance, ERCC1 et XPD sont les premières cibles identifiées concernant la toxicité chronique à l'oxaliplatine* et pourraient donc être explorées plus avant dans des études prospectives d'adaptation posologique calquées sur le schéma de l'étude « FOLFIRI-Cetuximab » (**Abstract N°3**) : Oxaliplatine à 100 mg/m² pour les patients hétérozygotes ou homozygotes sauvages, 85 mg/m² pour les homozygotes mutés T/T pour ERCC1 118 C>T et/ou C/C pour XPD 751 A>C (respectivement 37,3 % et 17 % dans notre étude).

Enfin, l'ensemble de nos conclusions et l'application clinique qui pourrait en être faite en pratique courante sont représentés par la **Figure 47 ci-après**.

Ainsi, et en sus du ciblage strictement biologique, l'objectif thérapeutique de l'oncologue doit bien être désormais l'individualisation du traitement. Cette individualisation ne pourra cependant se faire que par la mise au point de tests simples, de routine, reproductibles, réalisés sur des plate-formes biologiques dédiées, et de coûts acceptables, mais à pondérer, au vu des économies qui seraient réalisées par la non réalisation de traitements inefficaces et la diminution de l'incidence des toxicités.

Ces tests doivent être fondés sur des polymorphismes hautement sélectionnés comme facteurs prédictifs (de toxicité comme de réponse), explorés par des études prospectives, axées sur des adaptations posologiques et/ou la sélection de sous-populations de patients, et non plus sur des études simplement ancillaires ou rétrospectives, ceci afin d'obtenir un niveau de preuve suffisant à leur validation en pratique courante.

TYMS, DPYD, MTHFR, XPD, ERCC1, Braf et PI3K rentrent dans ce cadre, grâce à des techniques à haut débit comme le pyroséquençage utilisé dans nos études. A l'avenir, ils devraient dans des situations clairement définies pour le praticien rejoindre la situation actuelle des mutations de Kras, situation caricaturale mais de fait hautement symbolique sur l'intérêt d'une telle approche qui doit tendre à se démocratiser aidé en cela par la réalisation d'études de grande ampleur et par des efforts de communication sur ce domaine de recherche

scientifique. Car la pharmacogénétique ne fait en définitive qu'appliquer en pratique clinique et à partir d'un rationnel fondé sur la compréhension des métabolismes complexes des médicaments, le principe de base en Médecine : « Primum non nocere ».

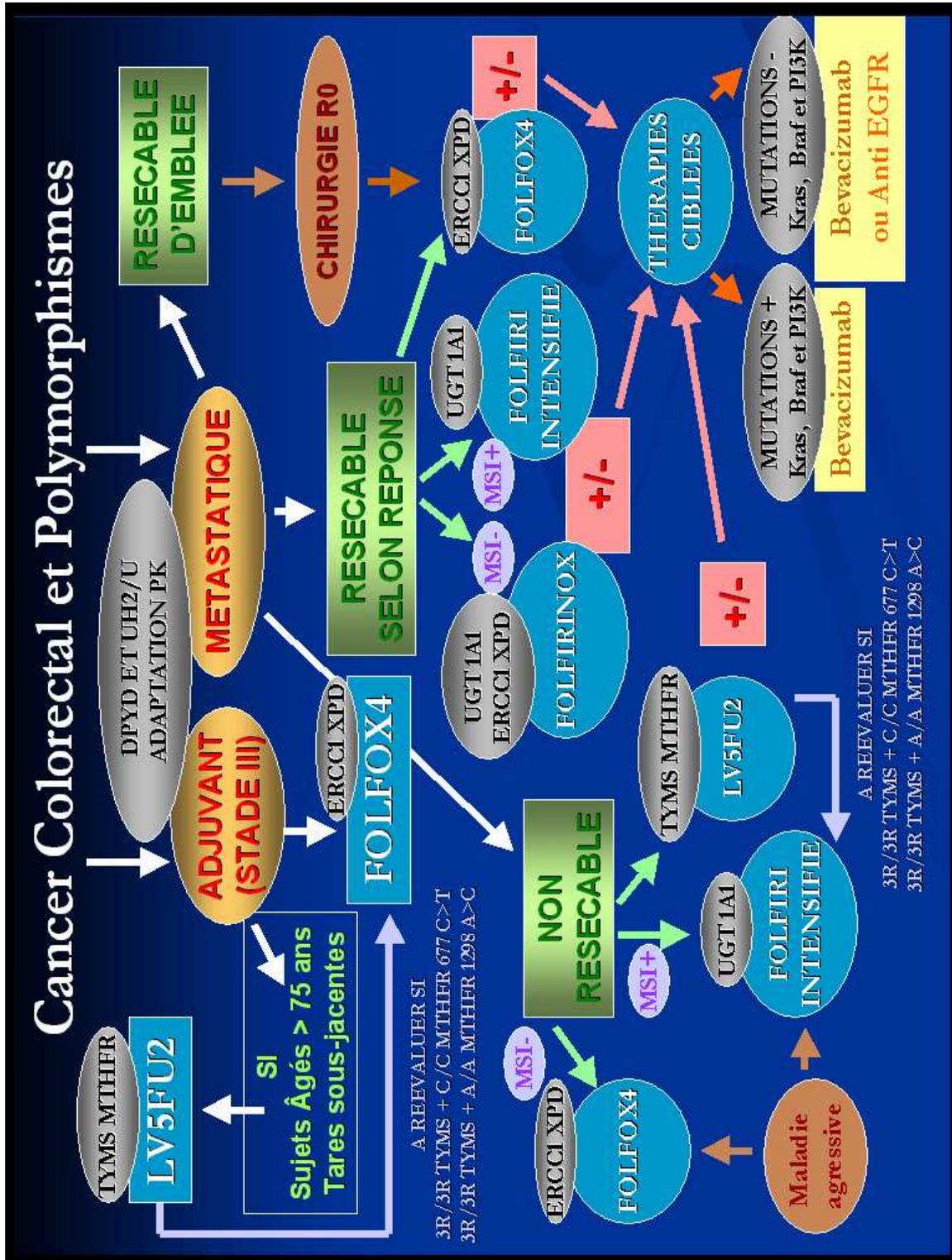


Figure 47. Résumé des polymorphismes étudiés et conséquences thérapeutiques.

V. LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

AGXT Glyoxylate Amino-Transferase

DPYD dehydropyrimidine dehydrogenase

5-FU 5-fluorouracil

ERCC1 Excision Repair Cross-Complementing group 1

GSTP1 Glutathione S-Transferase π 1

L-OHP oxaliplatin

MTHFR Methylene Tetra-Hydro-Folate Reductase

SNP single-nucleotide polymorphism

TYMS thymidylate synthase

UGT 1A1 uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1

XPA, XPB, XPD Xeroderma Pigmentosum Group A, B and D

XRCC1 X-ray repair cross-complementing group 1 protein

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depestre D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Br Med J* 1993; 306 (6880): 752-5.
2. Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1992; 10(6): 904-11.
3. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate [see comments]. *J Clin Oncol*. 1992; 10(6): 896-903.
4. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Meta-analysis of randomized trials testing the biochemical modulation of fluorouracil by methotrexate in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1994; 12: 960-9.
5. Meta-analysis Group in Cancer. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 301-8.
6. De Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, *et al*. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 808-15.
7. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiulo R, Focan C, *et al*. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 136-47.
8. Gamelin E, Jacob J, Danquechin-Dorval E, Pezet D, Delva R, Raoul JL, *et al*. Multicentric randomized trial comparing in weekly treatment of advanced colorectal cancer (CRC) intensified 5-fluorouracil and folinic acid (FA) with 5-FU pharmacokinetic monitoring to a constant dose calculated with body surface area. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1998; 17:271a.
9. Rougier P, Bugat R, Douillard JY, Culine S, Suc E, brunet P, *et al*. Phase II study of irinotecan in the treatment of advanced colorectal cancer in chemotherapy-naïve patients and patients pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997; 15: 251-60.
10. Ducreux M, Ychou M, Seitz JF, Bonnay M, Bexon A, Armand JP, *et al*. Irinotecan combined with bolus fluorouracil, continuous infusion fluorouracil, and high-dose leucovorin every two weeks (LV5FU2 Regimen): a clinical dose-finding and pharmacokinetic study in patients with pretreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2901-8.
11. Vanhoefer U, Harstrick A, Cone CH, Achterrath W, Frustums YM, Seeber S, *et al*. Phase I study of a weekly schedule of irinotecan, high-dose leucovorin, and infusional fluorouracil as first-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 907-13.

12. Bécouarn Y, Ychou M, Ducreux M, Borel C, Bertheault-Cvitkovic F, Seitz JF, *et al.* Oxaliplatin (L-OHP) as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients: preliminary activity/toxicity report. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997; 16: 229a.
13. De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, *et al.* Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-47.
14. Tournigand C, Louvet C, Quinaux E, André T, Lledo G, Flesch M, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX versus FOLFOX followed by FOLFIRI in metastatic colorectal cancer (MCRC): final results of a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 124a.
15. Tournigand C, Andre T, Achille E, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-37.
16. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, *et al.* Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670-6.
17. Hurwitz H, Fehrenbacher I, Novotny W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2004; 350: 2335-42.
18. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008; 28: 689-90.
19. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013-19.
20. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-44.
21. Grothey A, Sugrue A, Purdie D, *et al.* Association, between exposure to bevacizumab (BV) beyond first progression (BBP) and overall survival (OS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): results from a large observational study (BRiTE). *Proc Am Soc Clin Oncol* 4036. Abstract.
22. Chen HX, Mooney M, Boron M, *et al.* Phase II multicenter trial of bevacizumab plus fluorouracil and leucovorin in patients with advanced refractory colorectal cancer: an NCI Treatment Referral Center Trial TRC-0301. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3354-60.
23. Jonker DJ, Karapetis CS, Moore M, *et al.* Randomized phase III trial of cetuximab monotherapy plus best supportive care (BSC) versus BSC alone in patients with pretreated metastatic epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive colorectal carcinoma: a trial of the National Cancer institute of Canada Clinical Trials Group (NCI-CTG) and the

Australasian gastro-Intestinal Trials Group (AGITG). Proc Am Assoc Cancer res 2007 LB1. Abstract.

24. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 1658-64.

25. Van Cutsem E, Nowacki M, Lang I, *et al.* Randomized phase III study of irinotecan and 5FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): the CRYSTAL Trial. Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 4000. Abstract.

26. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004; 351: 337-45.

27. Taberero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, *et al.* Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 5225-32.

28. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, *et al.* Cetuximab plus 5FU-oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomized phase II study. Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 4035. abstract.

29. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, *et al.* FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. J Clin Oncol 2007; 25: 3712-8.

30. Buyse M, Burzykowski T, Carroll K, Michiels S, Sargent DJ, Miller LL, Elfring GL, Pignon JP, Piedbois P. Progression-free survival is a surrogate for survival in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 5218-24.

31. Tang PA, Bentzen SM, Chen EX, Siu LL. Surrogate end points for median overall survival in metastatic colorectal cancer: literature-based analysis from 39 randomized controlled trials of first-line chemotherapy. J Clin Oncol. 2007 ; 25: 4562-8.

32. Beaune P, Lorient MA. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. Médecine/Sciences 2000; 16:1051-6.

33. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 1999;286:487-91.

34. Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. Ergebnisse der Inneren Medizin 1959;12:52-125.

35. Beutler E. Study of glucose-6-phosphate deshydrogenase: history and molecular biology. Am J Hematol 1993; 42:53-8.

36. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TiPS* 1999; 20:342–9.
37. Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolising enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:27–41.
38. Oscarson M. Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medicine. *Clin Chem LabMed* 2003; 41:573–80.
39. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:99–108.
40. Meyer UA. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 66–7.
41. Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38:61–8.
42. Nagasubramanian R, Innocenti F, and Ratain MJ. Pharmacogenetics in cancer treatment. *Annu Rev Med* 2003; 54: 437-52.
43. Walgren RA, Meucci MA, McLeod HL. Pharmacogenomic discovery approaches: will the real genes please stand up?. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7342-49.
44. Marsh S, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *British J Cancer*. 2004; 90: 8-11.
45. Shimoyama S. Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *J Gastroenterology and Hep*. 2009; 24: 970-981.
46. Lee W, Lockhart C, Kim RB, Rothenberg ML. Cancer pharmacogenomics: Powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncol* 2005; 10: 104-111.
47. Heidelberger C, Chaudhari NK, Danenberg P, et al. Fluorinated pyrimidines: a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature*. 1957; 179:663-666.
48. Pinedo HM, Peters GFJ. Fluorouracile: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988; 6:1653-1664.
49. Machover D. A comprehensive review of 5-fluorouracile and leucovorin in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997; 80(7):1179-1187.
50. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR et al. Fluorouracile in colorectal cancer- a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol*. 1997; 15:368-381.
51. Tillman ST, Petak I, Houghton JA. A Fas-dependent component in 5 fluorouracile/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:425-430.

52. Fischhorst ST, Muerkoster S, Weigand MA, et al. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracile induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system. *Cancer Res.* 2001; 61:243-248.
53. Maecker HL, Koumenis C, Giacca AJ. P53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res.* 2000; 60:4638-4644.
54. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracile. *Pharmacol Ther.* 1990; 48:430-437.
55. Meta-analyse Group in Cancer. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracile compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16:301-308.
56. Gamelin E, Muratet JP, Allain P, Gamelin L, Maillart P, Larra F. Fluorouracile cardiac toxicity: results of a 3 years prospective study. Involvement of cisplatinum. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1993; 34:1312.
57. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Bea RF, Ramnavaine ML, Mirkin BL. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with sever fluorouracile toxicity. *N Eng J Med.* 1985; 313:245-249.
58. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracile chemotherapy. *Cancer Res.* 1993; 53:5433-5438.
59. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, Schneider M, Demard F and Milano G. Population study of dihydropyrimidine in cancer patients. *J Clin Oncol.* 1994, 12:2248-2253.
60. Fleming RA, Milano G, Etienne MC et al. No effect of dose, hepatic function or nutritional status on following continuous (5 days), FU infusion. *Br J Cancer.* 1992,66:668-672.
61. Milano G, Etienne MC, Cassuto-Viguier E et al. Influence of sex and age on fluorouracile clearance. *J Clin Oncol.* 1992,10:1171-1175.
62. Fleming R, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renee N, Schneider M, et al. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracile in cancer patients. *Cancer Res.* 1992; 52:2899-2902.
63. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracile (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol.* 1999; 17:1105-1110.
64. Danenberg P. Thymidylate synthase- a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochem Biophys Acta.* 1977; 473:73-92.

65. Wolberg WH, Morin J. Thymidylate synthetase activity and fluorouracile sensitivity of human colonic cancer and normal mucosal tissue preparations. *Cancer*. 1981; 47:1313-1317.
66. Johnston PG, Drake JC, Trepel J, et al. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracile-sensitive and –resistant h cancer cell lines. *Cancer Res*. 1992; 52:4306-4312.
67. Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, and Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 2-3:164-173.
68. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV and Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracile in human colorectal and gastric tumors. *Cancer res*. 1995; 55:1407-1412.
69. Chu E, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase in cellular regulation. *Advan Enzyme Regul*. 1996; 36:143-163.
70. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat*. 2000; 16:528-533.
71. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*. 1995; 20(3):191-197.
72. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, and Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:4096-4101.
73. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2001; 1(1):65-70.
74. Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, Francoual M, Formento P, Renee N, Chamorey E, Bourgeon A, Seitz JF, Delpero JR, Letoublon C, Pezt D, Milano G. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracile chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol*. 2002; 20(12):2832-2843.
75. Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracile. *Br J Cancer*. 2001; 85(6):827-830.
76. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res*. 2003; 63:6004-6007.

77. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, and Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* 2003; 63:2898-2904.
78. Marcuello E, Altes A, Del Rio E, Cesar A, Menoyo A and Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracile-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2004; 112:733-737.
79. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, et al. A 6 pb polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics.* 2004; 14:319-327.
80. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracile and methotrexate. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96:134-144.
81. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:1611-1615.
82. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracile-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics.* 2004; 14:1-8.
83. Largillier R, Formento JL, Ginot A, et al. Thymidylate synthase (TS) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms: relationships with capecitabine pharmacodynamics in advanced breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2004; 23:142 (abst. # 2062).
84. Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, and Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracile sensitivity. *J Clin Oncol.* 2005; 23:1365-1369.
85. Lu JW, Gao CM, Wu JZ, et al. Relationship of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and chemosensitivity to 5-fluorouracile in gastric carcinoma. *Chinese J Cancer* 2004; 23:958-962.
86. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail HT, and Sim GA. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88: 3888-90.
87. Horwitz SB, Chang CK, Grollman AP. Studies of camptothecin, I: effects of nucleid acid and protein synthesis. *Mol Pharmacol* 1971; 7: 632-44.
88. Creaven PJ and Allen LM. Renal clearance of camptothecin (NSC-100880): effect of urine volume. *Cancer Chemother. Rep.* 1973, 57: 175-84.

89. Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB, Oliverio VT, and Block JB. Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemother. Rep.* 1970, 54: 461–70.
90. Tanizawa A, Fujimori A, Fujimori Y, Pommier Y. Comparaison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (11):836-42.
91. Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, *et al.* Randomized trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352 (9138): 1407-12.
92. Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, Niederle N, Possinger K, Labianca R, Navarro M, *et al.* Randomized trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352 (9138): 1407-12.
93. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355(9209):1041-47.
94. Hurwitz H, Fehrenbacher I, Novotny W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2004; 350: 2335-42.
95. Van Cutsem E, Lang I, D'Hans G *et al.* Kras status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: the CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 2008; 26 may 20, Suppl, abstr2.
96. Abigeres D, Armand JP, Chabot GG *et al.* Irinotecan (CPT-11) high-dose escalation using intensive high-dose loperamide to control diarrhea. *J Natl Cancer Inst*; 1994; 86(6): 446-9.
97. Tournigand C, Louvet C, Quinaux E, André T, Lledo G, Flesch M, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX versus FOLFOX followed by FOLFIRI in metastatic colorectal cancer (MCRC): final results of a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 124a.
98. Tournigand C, Andre T, Achille E, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-37.
99. Mathijssen RHJ, Van Alphen RJ, Verweij J, *et al.* Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2182-94.
100. Sparreboom A, *et al.* Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2747-54.
101. Lokiec F, Monegier du Sorbier B, *et al.* Irinotecan (CPT-11) metabolites in human bile and urine. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1943-49.

102. Sugiyama Y, Kato Y, Chu X. Multiplicity of biliary excretion mechanisms for the camptothecin derivative irinotecan (CPT-11), its metabolites SN-38, and its glucuronide: role of canalicular multispecific organic anion transporter and P-glycoprotein. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 1998; 42 Suppl: S44-49.
103. Tang W, Yi C, Kalitsky J, *et al.* Endotoxin downregulates hepatic expression of P-glycoprotein and MRP2 in 2-acetylaminofluorene-treated rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 4:90-7.
104. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, *et al.* Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res* 1994; 54: 3723-5.
105. Kudoh S, Fukuoka M, Masuda N, *et al.* Relationship between the pharmacokinetics of irinotecan and diarrhea during combination chemotherapy with cisplatin. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 406-13.
106. Sasaki Y, Hakusui H, Mizuno S, *et al.* A pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of CPT-11 and its active metabolite SN-38. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86:101-10.
107. Raymond E, Boige V, Faivre S, *et al.* Dosage adjustment and pharmacokinetic profile of irinotecan in cancer patients with hepatic dysfunction. *J Clin Oncol* 2002; 20:4303-12.
108. RCP Campto (irinotecan).
URL:<http://afssapsprd.affsaps.fr/php/ecodex/rcp/R0090180.htm>
109. Sparreboom A, Loos WJ. Protein binding of anticancer drugs, in: *Handbook of anticancer pharmacokinetics and pharmacodynamics*, Figg WD and McLeod HL, Editors. ,2004Humana Press, Totowa, NJ, pp 169-88.
110. Gupta , Mick R, Ramirez J, Wang X, Lestingi TM, Vokes E, and Ratain MJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1502-10.
111. Van der Bol JM, Mathijssen RH, Loos WJ, *et al.* Cigarette smoking and irinotecan treatment: pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2719-26.
112. Kehrer DF, Mathijssen RH, Verweij J, de Bruijn P, Sparreboom A. Modulation of irinotecan metabolism by ketoconazole. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3122-9.
113. Haaz M.C, Rivory LP, Riché C, Robert J. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A (CYP3A) and drug interactions. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997;38: 17.
114. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR *et al.* Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Investig* 1998; 101: 847-54.

115. Butler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 8170-4.
116. Vanhoefler U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1501– 18.
117. Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1*28 gene. *J Hepatol* 2000; 33: 348–51.
118. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, del Rio E, Gomez-Pardo M and Baiget M. UGT1A1*28 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J of Cancer* 2004; 91: 678-82.
119. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyl-transferase (UGT1A1*28) causing Crigler-Najjar and Gilbert's syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 16: 297-306.
120. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, *et al.* UGT1A1*27 genotype and irinotecan-induced neutropenia: Dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1290-95.
121. Roth AD, Yan P, Dietrich D, Fiocca R, Bodoky G, Labianca R, Cunningham D, Van Cutsem E, Bosman F, Tejpar S. Is UGT1A1 *28 homozygosity the strongest predictor for severe hematotoxicity in patients treated with 5-Fluorouracil-irinotecan? Results of the PETACC3-EORTC 40993-SAKK60/00 trial comparing IRI/5-FU/folinic acid to 5-FU/FA in stage II-III colon cancer patients. *Proc Am Soc Clin Onco. J Clin Oncol* 2008; 26(suppl): abstract 4036.
122. Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, *et al.* UGT1A7 and UGT 1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1226-36.
123. Hoskins JM, Marcuello E, Altés A, *et al.* Irinotecan pharmacogenetics: Influence of pharmacodynamic gene. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1788-96.
124. Huang MJ, Yang SS, Lin MS, *et al.* Polymorphisms of uridine-diphosphoglucuronosyltransferase 1A7 gene in Taiwan Chinese. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 797-802.
125. Carlini *et al.* ASCO 2004 Abst 3623.
126. Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M, *et al.* Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7 and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2457-65.

127. Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, *et al.* Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3246-53.
128. Eng WK, Faucette L and Johnson RK. *Mol.Pharmacol* 1988; 34, 755–60.
129. Tsurutani J, Nitta T, Hirashima T, Komiya T, Uejima H, Tada H, Syunichi N, Tohda A, Fukuoka M and Nakagawa K. *Lung Cancer* 2002 : 35, 299–304.
130. Rasheed1 ZA and Rubin EH. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* 2003; 22, 7296–7304.
131. Eastman A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro (ethylenediamine) platinum (II) with DNA. *Biochemistry* 1986; 25: 3912-5.
132. Fichtinger-Schepman AM, Van der Veer JL, den Hartog JH, *et al.* Adducts of the antitumor drug cisdiamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 1985; 24: 707-13.
133. Johnson SW, Stevenson JP, O'Dwyer PJ. *Platinum Agents*. 2005; pp 185-97.
134. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiulo R, Focan C, *et al.* Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 136-47.
135. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(19):3109-16.
136. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Raymond E. Oxaliplatin effects on naked and intracellular DNA. *Proc Am Assoc cancer Res* 1997; 38: 2083.
137. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, *et al.* Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1205-18.
138. Mandal R, Kalke R, Li XF. Interaction of oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of a heme group. *Chem Res Toxicol* 204 ; 17: 1391-7.
139. Ashley AC, Sargent DJ, Alberts SR, *et al.* Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX): intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110:670-677.
140. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, William GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004; 9:8-12.
141. Hochster HS, Grothey A, Childs BH. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4028-4029.
142. Susman E. Xaliproden lessens oxaliplatin-mediated neuropathy. *Lancet Oncol* 2006; 7:288.

143. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1247-1254.
144. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloria MA. Glutathione-S-Transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3050-3056.
145. Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat rev Drug Discov* 2004; 3:11-12.
146. Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Morel A, *et al.* Oxaliplatin neurotoxicity. *Bull Cancer* 2006; 93 (Suppl 1): S17-S22.
147. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, *et al.* Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995; 86: 1903-10.
148. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81: 151-7.
149. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 9-23.
150. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, *et al.* Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 929-37.
151. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993; 268: 20116-25.
152. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, *et al.* High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3070-4.
153. Hosking LK, Whelan RD, Shellard SA, *et al.* An evaluation of the role of glutathione and its associated enzymes in the expression of differential sensitivities to antitumour agents shown by a range of human tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 1833-42.
154. Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, *et al.* Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1859-65.
155. Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, *et al.* Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Arch* 2005; 447: 626-33.
156. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, *et al.* Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994; 94: 703-8.

157. Dabholkar M, Thornton K, Vionnet J, *et al.* Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum resistant human ovarian cancer tissues. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1611-9.
158. Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, *et al.* HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10394-8.
159. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews* 2007; 7: 573- 584.
160. Rouits E, Boisdrion-Celle M, Dumont A, Guerin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of Different UGT1A1*28 Polymorphisms in Irinotecan-Induced Toxicity: A Molecular and Clinical Study of 75 Patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5151-515.
161. Boisdrion-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, Gamelin E. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer letters* 2007; 249:271-82.
162. Popat S, Matakidou A, and Houlston R. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):529-536.
163. Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, Takasaki K, Danenberg KD, Danenberg PV. Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2):433-439.
164. Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, and Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4797-4802.
165. Gorlick R, Metzger R, Danenberg KD, Salonga D, Miles JS, Longo GS, Fu J, Banerjee D, Klimstra D, Jhanwar S, Danenberg PV, Kemeny N, and Bertino JR. Higher levels of thymidylate synthase gene expression are observed on pulmonary as compared with hepatic metastases of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1465-1469.
166. Marsh S, Collie-Duguid E, Li T, Liu X, and McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999; 58: 310-312.
167. Koopman M, Antonini NF, Douma J, *et al.* Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 135-42.

168. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 143-52.
169. Bouché O, Castaing M, Etienne PL, *et al.* Randomized strategical trial of chemotherapy in metastatic colorectal cancer (FFCD 2000-2005): preliminary results. *Proc Am Soc clin Oncol* 2007; 25: 4069. Abstract.
170. Marcuello E, Altes A, Del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112: 733-737.
171. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PI3KCA mutations in gastric and colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005, 41(1): 1649-1654.
172. Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4055-61.
173. Hochster HS, Grothey A, Childs BH. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 1; 25(25):4028-9. Epub 2007 Jul 30
174. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: Involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* 2009; Sep 24. [Epub ahead of print].
175. Hochster HS, Grothey A, Childs BH. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4028-29.
176. Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Donde E, Tredici P, Marmioli P, Minoia C, Ronchi A, Bayssas M, Etienne GG. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Ur J Cancer* 2001; 37: 2457-63.
177. Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia *in vitro* explant culture model. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 29-38.
178. Mc Keage MJ, su T, Screnci D, Haddad G, Baguley BC. Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. *Br J Cancer* 2001; 85: 1219-25.
179. Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin J.C, et al. ERCC1 Codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-Fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17): 6212-6217.

180. Park D.J, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3):162-166.
181. Chang P.M, Tzeng C.H, Chen P.M, Lin J.K, Lin T.C, Chen W.S, et al. ERCC1 codon 118 C>T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2008 [Epub ahead of print].
182. Braithwaite E, Wu X, Wang Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat Res* 1999; 424(1-2):207-219.
183. Keam B, Im SA, Han SW, Ham HS, Kim MA, Oh DY, et al. Modified FOLFOX-6 chemotherapy in advanced gastric cancer: results of phase II study and comprehensive analysis of polymorphisms as a predictive and prognostic marker.
184. Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, et al. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2009 [ahead of print].
185. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(6):1797-1803.
186. Youn CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chang IY, Chung MH, and You HJ. Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from Platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* 2004; 64: 4849-57.
187. Iannino N, Martin B *et al.* The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005; 17: 131-9
188. Loriot Y, Mordant P, Deutsch E et col. Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6(9):528-34.
189. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, Taylor G, Barrett JH, and Quirke P. *KRAS* and *BRAF* mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: Results from the MRC FOCUS Trial. *J Clin Oncol* 2009 Nov. [Epub ahead of print].
190. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Serban Donean S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, and Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-71.
191. Marsh S, Mallon MA, Goodfellow P, Mcleod HL. Concordance of pharmacogenetic markers in germline and colorectal tumour DNA. *Pharmacogenomics* 2005; 6: 873-877.
192. McWhinney SR, Mcleod HL (2009) Using germline genotype in cancer pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 480-493.

193. Youn CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chang IY, Chung MH, You HJ. Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* 2004; 64(14): 4849-57. Erratum in: *Cancer Res* 2004; 64(22): 8484.
194. Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 2004; 14(11): 639-47. Review.
195. Andrieux LO, Fautrel A, Bessard A, Guillouzo A, Baffet G, Langouët S. GATA-1 is essential in EGF-mediated induction of nucleotide excision repair activity and expression through ERK2 in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2007; 67: 2114-2123.
196. Tournigand C, Cervantes A, Figer A, Iledo G, Flesch M, Buyse M, *et al.* OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop and go fashion in advanced colorectal cancer – a GERCOR study. *J Clin Oncol* 2009; 24: 394-400.
197. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, *et al.*: Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:5705-5712, 2008.