



**HAL**  
open science

# Caractérisation pharmacogénétique des facteurs de résistance et de toxicité de l'Oxaliplatine et de l'Irinotécan dans les tumeurs colorectales

Andreea Asevoaia

► **To cite this version:**

Andreea Asevoaia. Caractérisation pharmacogénétique des facteurs de résistance et de toxicité de l'Oxaliplatine et de l'Irinotécan dans les tumeurs colorectales. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00594855

**HAL Id: tel-00594855**

**<https://theses.hal.science/tel-00594855>**

Submitted on 21 May 2011

**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.

# Caractérisation pharmacogénétique des facteurs de résistance et de toxicité de l'Oxaliplatine et de l'Irinotécan dans les tumeurs colorectales

---

Thèse de Doctorat

**Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 13 décembre 2010**

**à : ANGERS (CRLCC Paul Papin)**

**par : Andreea ASEVOAIA**

**Devant le jury ci-dessous :**

**François SICHEL (rapporteur)**, Professeur, Université de Caen Basse - Normandie

**Chantal LE GUELLEC (rapporteur)**, Maître de conférences, Université de Tours

**Stéphane BEZIEAU (examineur)**, Professeur, Université de Nantes

**Erick GAMELIN (examineur)**, Professeur, Université d'Angers

**Alain MOREL (invité)**, Professeur, Université d'Angers

**Directeur de thèse : Alain MOREL**, Professeur, Université d'Angers

**Nom et Coordonnées du Laboratoire :**

Institut régional de recherche en cancérologie Nantes / Angers INSERM U892, Axe 12

2 rue Moll 49033 ANGERS Cedex 9 ; Tél : 02.41.35.27.00

**ED 502**

## ***Remerciements***

Au terme de cette recherche, je suis heureuse de pouvoir remercier tous ceux et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure ou qui ont croisé ma route et grâce à qui j'ai pu avancer.

Je tiens tout d'abord à remercier ***le Pr. Erick Gamelin*** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire d'ocopharmacologie du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, dès la sortie de ma maîtrise et de m'avoir permis d'y effectuer également ma thèse. Tout au long de cette aventure, j'ai apprécié sa gentillesse, sa disponibilité et l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail.

Je remercie tout particulièrement ***le Pr. Alain Morel*** pour sa grande disponibilité dans la direction de cette thèse. Pendant toutes ces années, il m'a fait confiance et il m'a laissé la liberté de choisir mes orientations scientifiques. Il a éclairé ce travail de ses conseils judicieux, il m'a prodigué ses encouragements tout au long de la thèse et il a su me faire partager ses nombreuses connaissances, sa vision toujours claire et synthétique.

J'adresse tout particulièrement ma reconnaissance au ***Dr. Michèle Boisdrion-Celle***, pour l'encadrement de cette thèse, pour ses conseils avisés, sa grande compétence, son enthousiasme, sa disponibilité et ses encouragements permanents.

Mes remerciements s'adressent à mes rapporteurs, ***le Pr. Chantal Le Guellec***, et ***le Pr. François Sichel*** qui me font l'honneur d'évaluer mon travail et de parcourir rétrospectivement l'ensemble de ma démarche scientifique. Je les remercie pour leur compétence et pour la spontanéité avec laquelle ils ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance à mes examinateurs, ***le Pr. Stéphane Bézieau***, et ***le Pr. Erick Gamelin***, qui ont eu la gentillesse de bien vouloir apporter leurs regards pertinents à l'évaluation de mon travail.

Je remercie chaleureusement à la ***Ligue Contre le Cancer*** pour le financement accordé pendant ces trois ans de thèse.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Papin et j'en remercie ici tous les membres.

Je remercie profondément le **Pr. Olivier Coqueret**. Je l'ai rencontré il y a presque 6 ans en tant que professeur de biologie cellulaire à l'Université d'Angers. Je l'admire pour sa passion et son pouvoir de transmettre à ses étudiants le goût pour la science.

Mes remerciements sont adressés à **Dr. Catherine Guette**, personne pour laquelle je garderai toujours beaucoup d'estime et une profonde reconnaissance.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les jeunes gens que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années à Angers.

« Faire une thèse » est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent. Merci à vous tous, mes amis: **Emilie, Sandy, Hélène, Sophie, Antony, Sory, Marie-Laure, Benjamin, Elisa et Laurance**. Merci à ceux qui sont déjà parti du labo et je pense ici à **Julia, Amélie, Agnès, Anne-Charlotte et Arno**.

Un grand merci aux docteurs **Pierre, Paule, Benjamin, Stéphanie et Clotilde** pour avoir partagé avec nous, les scientifiques, un peu de leurs expériences médicales.

Merci au **Dr Olivier Ingster** pour sa disponibilité, son écoute, ses conseils et sa bonne humeur que j'ai particulièrement appréciés lors du démarrage de l'essai clinique « Recherche Oncogènes ».

Un grand merci à la troupe des stagiaires : **Mariana, Stéphanie, Laure, Jérôme, Audrey, Grégoire et Damian** : Merci pour votre belle énergie!

Merci au **Dr Olivier Capitain** pour son aide précieuse lors de la réalisation des deux études cliniques.

Merci à ma statisticienne préférée, **Anne-Lise Poirer**, pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée pour la préparation et l'interprétation de la partie statistique de ce travail.

Mes remerciements chaleureux s'adressent aux irremplaçables membres du laboratoire d'oncopharmacologie : à **Luc** pour m'avoir guidé au début de cette aventure scientifique, à **Sabrina, Marie Claire, Catherine, Julie et Alice**.

Merci à tous mes amis qui m'ont permis de m'aérer l'esprit quand je n'étais pas au laboratoire et qui ont parfois du subir quelques monologues scientifiques toutefois bien vite interrompus. Merci donc à **Sorin et Cristina Voiculescu, Adrien et Dana Picardeau, Razvan et Nicoleta Lupan, Erik et Florina Ménard, Serban Chisacof**.

Mes derniers remerciements, et non des moindres, iront à ma famille et à mon compagnon Alin, sans lesquelles tout cela n'aurait aucun sens. Merci *maman* et merci à toi *papa*, vous qui m'avez toujours encouragé dans cette voie sans jamais m'y pousser. Sans vous, je ne serai pas là. Cette thèse est un peu la votre, aussi !!!

Merci enfin à toi *Alin* d'avoir été à l'écoute toutes ces années, d'avoir été patient lorsque les expériences ratées déteignaient sur mon humeur, de m'avoir toujours encouragé, et de m'avoir autant facilité les choses notamment durant ces derniers longs mois. T'as été toujours présent pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Merci infiniment !!!

Merci à mes frères *Iulian et Adrian* pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien, à mes grands-parents, à *Cris et Horia* et à tous auxquels j'ai si souvent manqué au long de ces années.

A ma petite *Bianca* : Merci pour la leçon de courage que tu me donne tous les jours; je suis très fière de toi !

Merci aux personnes qui m'ont suivi ou que j'ai rencontré dans ce voyage, qui ont collaboré à faire de cette aventure une expérience humaine enrichissante, et qui, au mieux de leur talent, ont contribué à faire de cette thèse ce qu'elle est.

## Table de matière

<b>Abréviations</b>	<b>9</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>11</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>14</b>
<b>I.1. Cancer colorectal</b>	<b>14</b>
<i>I.1.1. Epidémiologie</i>	14
<i>I.1.2. Cancérogenèse colorectale</i>	14
I.1.2.1. Instabilité chromosomique et les tumeurs LOH (Loss of Heterozygoty)/CIN (Chromosomal Instability)	15
I.1.2.2. Instabilité microsatellitaire et les tumeurs MSI	19
<i>I.1.3. Traitements et chimiothérapies</i>	20
I.1.3.1. K-Ras et les thérapies « ciblées »	21
<b>I.2. La pharmacogénétique des cytotoxiques « classiques » utilisés dans le cancer colorectal métastatique</b>	<b>22</b>
<i>I.2.1. 5 - Fluorouracile (5-FU)</i>	23
I.2.1.1. Présentation de la molécule	23
I.2.1.2. Métabolisme du 5-FU	23
I.2.1.3. Facteurs génétiques associés aux toxicités au 5-FU	27
I.2.1.3.1. Dihydropyrimidine Deshydrogénase (DPD)	28
I.2.1.4. Facteurs génétiques modulant la réponse au 5-FU	30
I.2.1.4.1. Thymidylate synthase (TS)	30
I.2.1.4.2. Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)	34
<i>I.2.2. Irinotécan</i>	36
I.2.2.1. Présentation de la molécule	36
I.2.2.2. Irinotécan comme inhibiteur de la Topoisomérase I	38
I.2.2.3. Métabolisme de l'Irinotécan	40
I.2.2.4. Facteurs pharmacogénétiques associés aux toxicités de l'Irinotécan : enzymes de métabolisme et enzymes cible	43
I.2.2.4.1. UDP-glucuronosyltransférases (UGTs)	44
I.2.2.4.2. Topoisomérase I	50
I.2.2.5. Facteurs pharmacogénétiques associés aux toxicités et à la résistance à l'Irinotécan : protéines transporteurs	52
I.2.2.5.1. Transporteurs membranaires : généralités et structure	52
I.2.2.5.2. Récepteurs nucléaires : généralités, structure	55

## Table de matière

<i>I.2.3. Oxaliplatine</i>	59
I.2.3.1. Présentation de la molécule	59
I.2.3.2. Mécanisme d'action de l'Oxaliplatine	62
I.2.3.3. Mécanismes impliqués dans la résistance à l'Oxaliplatine	64
I.2.3.4. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance/toxicité à l'Oxaliplatine : Système de détoxification cellulaire	65
I.2.3.4.1. GSTs (Glutathione S-transférases)	67
I.2.3.5. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance à l'Oxaliplatine : Système de réparation par excision de nucléotides (NER)	69
I.2.3.5.1. Nucléases de NER	72
I.2.3.6. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance à l'Oxaliplatine : Système de réparation par excision des bases (BER)	77
I.2.3.6.1. XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1)	78
<b>I.3. Présentation du travail de thèse</b>	<b>79</b>
<b>II. Patients, Matériels et Méthodes</b>	<b>82</b>
<b>II.1. Identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l'Irinotécan et à l'Oxaliplatine</b>	<b>82</b>
II.1.1. <i>Patients</i>	82
II.1.1.1. Description des protocoles chimiothérapeutiques	83
II.1.1.2. Evaluation des paramètres cliniques	83
II.1.2. <i>Sélection des SNPs</i>	85
II.1.3. <i>Méthodes de génotypage</i>	85
II.1.3.1. Isolement des leucocytes l'ADN génomique	85
II.1.3.2. Isolement de l'ADN génomique	85
II.1.3.3. Amplification par PCR des séquences d'ADNg contenant les mutations recherchées	86
II.1.3.4. Mini-séquençage luminométrique en temps réel	86
II.1.4. <i>Méthodes statistiques utilisées</i>	90
<b>II.2. ERCC1 et son rôle dans la résistance à l'Oxaliplatine</b>	<b>90</b>
II.2.1. <i>Etude de cytotoxicité à l'Oxaliplatine</i>	91
II.2.1.1. Lignées cellulaires	91
II.2.1.2. Test de la croissance cellulaire au SRB (Sulforhodamine B)	91
II.2.2. <i>Modulation de l'expression d'ERCC1 par l'Oxaliplatine</i>	92
II.2.2.1. Évaluation de l'expression d'ARNm d'ERCC1 par RT-PCR	92
II.2.2.1.1. Extraction d'ARNm et la Transcription inverse	93
II.2.2.1.2. PCR quantitative en temps réel	93
II.2.2.2. Évaluation de l'expression de la protéine ERCC1 par Western Blot	95

## Table de matière

II.2.2.3.	Analyse de l'expression d'ERCC1 par FACS	96
II.2.2.4.	Etude de la localisation cellulaire d'ERCC1	96
II.2.2.4.1.	Etude de la localisation de la protéine ERCC1 par Immunofluorescence	96
II.2.2.4.2.	Etude de la localisation de la protéine ERCC1 par Western Blot	97
II.2.3.	<i>Impact de l'inhibition ou de la surexpression d'ERCC1 sur la survie cellulaire en présence de l'Oxaliplatine</i>	97
II.2.3.1.1.	Construction d'un vecteur d'expression d'ERCC1	98
II.2.3.1.2.	Surexpression ou inhibition d'ERCC1	99
II.2.3.1.3.	Test de la croissance cellulaire au SRB (Sulforhodamine B)	99
II.2.4.	<i>Impact de l'inhibition ou de la surexpression d'ERCC1 sur l'expression d'ARNm des certains gènes pouvant être à l'origine des résistances</i>	100
II.2.4.1.1.	Inhibition d'ERCC1	100
II.2.4.1.2.	Surexpression d'ERCC1	100
II.2.4.1.3.	Extraction d'ARNm et la Transcription inverse	101
<b>II.3.</b>	<b>Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux</b>	<b>101</b>
II.3.1.	<i>Détermination in vitro du seuil de détection des mutations de K-Ras par pyroséquençage</i>	101
II.3.1.1.	Dilutions réalisées	102
II.3.1.2.	Analyse des échantillons par pyroséquençage	102
II.3.2.	<i>Etude STIC Phase I</i>	103
II.3.2.1.	Détection des mutations du K-Ras par pyroséquençage	103
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>104</b>
<b>III.1.</b>	<b>Identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l'Irinotécan et à l'Oxaliplatine</b>	<b>104</b>
III.1.1.	<i>Identification des facteurs génétiques influençant la tolérance et l'efficacité de l'Irinotécan dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques</i>	104
III.1.1.1.	Présentation du travail	105
III.1.1.2.	Résultats	106
III.1.1.3.	Discussion	109
III.1.1.4.	Publication 1	113
III.1.1.5.	Publication 2	138
III.1.2.	<i>Identification des facteurs génétiques influençant la tolérance et l'efficacité de l'Oxaliplatine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques</i>	163
III.1.2.1.	Présentation du travail	163
III.1.2.2.	Résultats	165
III.1.2.3.	Discussion	169
III.1.2.4.	Publication 3	175
III.1.2.5.	Publication 4	210



<b>III.2. ERCC1 et son rôle dans la résistance à l’Oxaliplatine</b>	<b>237</b>
<i>III.2.1. Détermination de l’activation d’ERCC1 par l’Oxaliplatine</i>	237
III.2.1.1. Etude de cytotoxicité à l’Oxaliplatine	237
III.2.1.2. Etude de la variation de l’expression d’ERCC1 au cours du temps	238
III.2.1.2.1. Evaluation de l’expression d’ARNm	238
III.2.1.2.2. Evaluation de l’expression de la protéine	239
III.2.1.3. Etude de la localisation cellulaire d’ERCC1	240
<i>III.2.2. Impact de l’inhibition ou de la surexpression d’ERCC1 sur la survie cellulaire en présence de l’Oxaliplatine</i>	242
III.2.2.1. Etude de la survie cellulaire	242
<i>III.2.3. Effet d’ERCC1 sur l’expression des gènes pouvant induire des résistances à l’Oxaliplatine</i>	245
<i>III.2.4. L’impact de statut mutationnel de Ras sur l’expression d’ERCC1</i>	247
<b>III.3. Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux</b>	<b>248</b>
<i>III.3.1. Détermination in vitro du seuil minimum de détection des mutations de K-Ras par pyroséquençage</i>	249
<i>III.3.2. Essai STIC : contrôle qualité de la technique du pyroséquençage</i>	252
<b>IV. Discussions, Conclusions et Perspectives</b>	<b>254</b>
<b>IV.1. L’identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l’Irinotécan et à l’Oxaliplatine</b>	<b>256</b>
<b>IV.2. ERCC1 et son rôle dans la résistance à l’Oxaliplatine</b>	<b>258</b>
<b>IV.3. Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux</b>	<b>262</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>266</b>
<b>Annexes</b>	<b>289</b>
<b>Annexe I : Séquence des amorces utilisées pour les PCR</b>	<b>289</b>
<b>Annexe II : Séquence des amorces utilisées pour les qPCR</b>	<b>290</b>

## Abréviations

**5,10-MeTHF** :5,10-méthylène tétrahydrofolate

**5-FdUDP** :5-Fluorodésoxyuridine diphosphate

**5-FdUMP** :5-Fluorodésoxyuridine

monophosphate

**5-FdUTR** :5-Fluorodésoxyuridine triphosphate

**5-FU** : 5-Fluoro Uracile

**5-FUDP** : 5-Fluorouridine diphosphate

**5-FUdr** : 5-Fluorodésoxyuridine

**5-FUH2** : 5-Fluoro-5,6-Dihydrouracile

**5-FUMP** : 5-Fluorouridine monophosphate

**5-FUTP** : 5-Fluorouridine triphosphate

**A** : Adénine

**ABC** : ATP-binding cassette

**ABC2** : Breast Cancer Resistance Protein

**Acides amines** : A (alanine), C (cystéine), D (aspartate), G (glycine), I (isoléucine), K (lysine), L (leucine), M (méthionine), Q (glutamine), R (arginine), T (thréonine), V (valine), W (thryptophane)

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**APC** : 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acide)]

**APC** : Adenomatous Polyposis Coli

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BER** : Base Excision Repair

**BSA** : Bovine Serum Albumin

**C** : Cytosine

**CCR** : Cancer Colorectal

**CPT** : Camptothécine

**CPT-11** : 7-ethyl-10-[4-(1-pipéridino)-1-pipéridino]-carbonyloxy-camptothécine /Irinotécan

**CSA**: Cockayne syndrome complementation group A

**CSB** : Cockayne syndrome complementation group B

**DACH**: 1,2 diaminocyclohexane

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DBD** : DNA Binding Domain

**DCC** : Deleted in Colorectal Cancer)

**DMSO** : DiMéthylSulfOxide

**dNTP** : désoxyribonucléotide triphosphate

**DO** : Densité Optique

**DPD**: Dihydropyrimidine Déshydrogénase

**DR** - Direct Repair

**DSBR** - Double-Strand Break Repair

**dTMP** : désoxythymidine monophosphate

**dUMP** : déoxyuridine mono-phosphate

**dUMP** : désoxyuridine monophosphate

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine tétraacétique

**ERCC1**: Excision Repair Cross-Complementation group 1

**ERCC2**: Excision Repair Cross-Complementation group 2

**FBA** :  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine

**FDA** : Food and Drug Administration

**FEN1** : Flap structure-specific endonuclease 1

**FITC** : Fluorescéine IsoThioCyanate

**FUPA** : acide 5-flourouréidopropionique

**G** : Guanine

## Abréviations

**G<sub>3</sub>PDH** : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase

**hMLH1** : human Mutant L Homologue 1

**HNF1** : Hepatocyte Nuclear Factor 1

**HNPCC** : Hereditary non polyposis colorectal cancer

**HRE** : Hormone Responsive Element

**K-Ras** : Kirsten Rat Sarcoma 2 viral oncogene homologue

**LBD** : Ligand Binding Domain

**LOH** : Loss of heterozygosity

**I-OHP** : Oxaliplatine

**LP-BER** : Long-patch Base Excision Repair

**MASA** : Mutant-Allele Specific Amplification

**MMR** : Mismatch Repair

**MSI** : Microsatellite instability

**MSS** : Microsatellite stability

**MTHFR** : Méthylène Tétrahydrofolate Réductase

**NBF** : Nucleotide Binding Folds

**NCI** : National Cancer Institute

**NER** : Nucleotide Excision Repair

**NLS** : Nuclear Localisation Signal

**NPC** : 7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino)carbo-nyloxycamptothécine

**O.R.** : odd ratio

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PAF** : Polypose Adénomateuse Familiale

**pb** : paire de base

**PCNA** : Prolifération cell nuclear antigen

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PXR** : Pregnane X Receptor

**RAS** : Rat Sarcoma

**RPA** : Replication Protein A

**RT-PCR** : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

**SAM** : S-adénosyl méthionine

**SG** : Survie globale

**siRNA** : short interfering RNA

**SMP** : Syndrome « Mains – Pieds »

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism

**SP-BER** : Short-patch Base Excision Repair

**SRB** : sulforhodamine B

**SSP** : Survie sans progression

**SVF** : Sérum de Veau Fœtal

**SXR** : Steroid Xenobiotic Receptor

**T** : Thymine

**T<sub>amb</sub>** : Température ambiante

**T<sub>m</sub>** : melting temperature

**TMD** : Transmembrane Domain

**TS** : Thymidylate Synthase

**TSER** : Thymidylate Synthase Enhancer Region

**TTD** : Trichothiodystrophy

**UGT**: Uridine diphosphate glucuronyltransferase family

**UGT1A1**: Uridine diphosphate glucosyltransferase 1 family polypeptidase A1

**UGT1A7**: Uridine diphosphate glucosyltransferase 1 family polypeptidase A7

**UH2** : Dihydrouracile

**USF-1** : Upstream Stimulatory Factor

**UV** : Ultra Violet

**XPA** : Xeroderma Pigmentosum groupe A

**XPB/ERCC3** : Xeroderma Pigmentosum, groupe B

**XPC** : Xeroderma Pigmentosum Grup C complementing protein

**XPF/ERCC4** : Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group

4

## Avant-propos

Le cancer colorectal constitue, comme l'indique les chiffres, un véritable problème de santé publique en France comme dans la plupart des pays occidentaux. A l'heure actuelle en France environ la moitié des cancers sont guéris par les moyens thérapeutiques conventionnels 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. Cependant, elle n'offre malheureusement toujours pas d'espoir de curabilité dans la majeure partie des cas. Le vrai défi dans la chimiothérapie des cancers reste la prédiction de la réponse thérapeutique en termes d'amélioration de l'efficacité du traitement, mais aussi du contrôle des effets toxiques qui peuvent, à l'extrême, mettre en danger la vie des patients.

En effet, il y a une grande variabilité inter-individuelle en termes de toxicités et de réponse pour les patients traités avec différentes molécules anticancéreuses. Cette variabilité inter-individuelle au niveau des réponses aux médicaments peut s'expliquer, en partie, par la variabilité génétique des enzymes du métabolisme, des transporteurs, des récepteurs ou des gènes cibles des molécules anticancéreuses [Evans *et al.*, 1999], ainsi que par la variabilité de certains facteurs individuels comme l'âge, le sexe, les fonctions rénale et hépatique du patient, mais également par l'interaction entre les différents médicaments utilisés dans le traitement chimiothérapeutique. Malgré l'importance clinique des facteurs individuels évoqués, il est reconnu que les différences au niveau du métabolisme et de l'excrétion peuvent avoir une influence plus importante sur l'efficacité et la toxicité des molécules anticancéreuses [Dorne *et al.*, 2004]. Dans ce contexte, 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. De plus, pour une même posologie de chimiothérapie, certains développent des effets secondaires majeurs quand ces derniers peuvent être tout à fait minimes pour d'autres.

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 sur le cas individuel du malade lui-même. Pour cela, l'objectif principal de la recherche en Oncologie Médicale est de prédire les populations de patients à risque d'échec de traitement et/ou à haut risque de toxicité. Dans ce cadre, la pharmacogénomique est devenue une nouvelle discipline qui a pour objectif d'aider le clinicien à adapter le traitement pharmacologique en fonction du profil génotypique d'un patient suite à la recherche des facteurs génétiques.

Les facteurs génétiques sont des variations communes au sein de la séquence de l'ADN qui sont responsables, dans certains cas, d'une diminution de l'activité du gène ou d'une augmentation de son activité [Evans *et al.*, 1999]. Ces variations apparaissent comme des insertions, délétions, réarrangements chromosomiques, polymorphismes mononucléotidiques (SNP pour *Single Nucleotide Polymorphism*) ou encore méthylations [Lee *et al.*, 2005].

Les altérations des activités des enzymes du métabolisme dû aux polymorphismes, peuvent conduire à l'altération de la cinétique de métabolisation de certains médicaments et donc à des réactions opposées chez les patients ayant reçu la même dose du médicament [Vesell *et al.*, 1986]. Dans le but d'une l'individualisation thérapeutique comprenant une sélection appropriée des médicaments et de leur dosage optimal pour chaque patient, la caractérisation des altérations génétiques modulant l'action des médicaments est devenue essentielle.

La classe de médicaments la plus soumise à des études pharmacogénétiques est celle des agents chimiothérapeutiques « classiques » dont l'index thérapeutique ou le rapport entre efficacité (effet sur la tumeur) et la tolérance (effets sur les tissus sains) de la thérapie est généralement très étroit. Ils sont donc plus sensibles aux variations métaboliques.

Le 5-Fluorouracile (5-FU), l'Irinotécan et l'Oxaliplatine font partie des cytotoxiques « classiques » utilisés en première ligne de traitement dans le cancer colorectal métastatique. Concernant ces molécules le but est d'améliorer l'index thérapeutique afin d'augmenter leur efficacité tout en limitant les effets secondaires grevant possiblement la qualité de vie du malade et pouvant être potentiellement mortels. Il s'agit donc d'exploiter au maximum le potentiel de ces agents chimiothérapeutiques pour finalement « faire mieux avec ce que l'on a ». 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

## Avant-propos

l'étude du devenir du médicament (*clairance*) dans l'organisme du chaque malade (*pharmacocinétique*).

Au stade métastatique, la stratégie thérapeutique a évolué considérablement ces dernières années avec l'utilisation de thérapies ciblées associées aux chimiothérapies traditionnelles. Les thérapies « ciblées » regroupent des médicaments dirigés contre des cibles moléculaires telles que de récepteurs, gènes ou protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires jouant un rôle dans la transformation des cellules en cellules cancéreuses ou dans le développement des tumeurs malignes. De ce fait, de nombreuses recherches sont orientées vers l'identification de nouveaux facteurs prédictifs de la réponse au traitement comme le statut de l'oncogène K-Ras (phénotype sauvage ou muté), afin de prédire la résistance ou non au traitement par les anticorps anti-EGFR. Les thérapies « ciblées », dont les mécanismes d'action et les profils de toxicité sont différents de ceux des chimiothérapies « classiques », en augmentent l'efficacité. Toutefois, les thérapies « ciblées » sont beaucoup plus chères et sont également soumises à l'acquisition des mécanismes de résistance habituellement observés avec les autres traitements anticancéreux, ce qui rend nécessaire une stratégie thérapeutique. De plus, cette stratégie thérapeutique servira également à une amélioration de la prise en charge individualisée des patients.

Donc, dans le cas particulier des thérapies « ciblées », les études de pharmacogénétiques peuvent aider le clinicien à affiner le choix des associations thérapeutiques afin que chaque patient reçoive « le bon traitement ».

Dans le contexte de l'individualisation thérapeutique le but de ce travail a été de déterminer, pour chacune des trois principales cytotoxiques « classiques » utilisés actuellement dans le traitement du cancer colorectal, en situations adjuvante et métastatique, des facteurs génétiques dont la variabilité était susceptible d'expliquer la résistance et la toxicité au traitement.

## I. Introduction

### I.1. Cancer colorectal

#### I.1.1. Epidémiologie

Le cancer colorectal représente un problème majeur en terme de santé publique puisqu'il est au 3<sup>ème</sup> rang des cancers en France, tous sexes confondus, avec 38 000 nouveaux cas par an, soit 15 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers. En France, c'est le second cancer chez la femme en terme d'incidence, après le cancer du sein. Il est le troisième cancer chez l'homme, derrière le cancer de la prostate et le cancer du poumon. La probabilité d'être atteint d'un cancer colorectal avant l'âge de 74 ans est de 4,9 % chez l'homme et de 2,9 % chez la femme [Remontet *et al.*, 2003]. Le cancer colorectal est la 2<sup>ème</sup> cause de décès par cancer en France, soit presque 16 000 décès par an (10,6 % des décès par cancer) [Bouvier *et al.*, 2004].

#### I.1.2. Cancérogenèse colorectale

Le cancer colorectal représente un modèle classique de cancérogenèse multi-étapes et se caractérise par l'apparition séquentielle d'anomalies (notamment les anomalies chromosomiques, nucléotidiques et épigénétiques), touchant de nombreux gènes cibles au sein de l'épithélium intestinal. L'étude des altérations génétiques, somatiques et constitutionnelles, associées aux cancers colorectaux a permis d'individualiser deux mécanismes moléculaires à l'origine du processus de cancérogenèse colorectale : l'instabilité chromosomique et l'instabilité microsatellitaire. Ces deux mécanismes à l'origine de la transformation maligne des cellules épithéliales coliques, sont différents et ciblent d'ailleurs des gènes distincts. Ils interagissent toutefois finalement à différents niveaux, sur les mêmes voies de signalisation impliquées lors de la transformation maligne. Ces deux types de prédisposition héréditaire majeurs confirment l'existence de deux principaux mécanismes moléculaires de transformation maligne des cellules coliques. Il s'agit, d'une part, de la polypose adénomateuse familiale (PAF), dont la survenue est due à une mutation

constitutionnelle du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). Toutes ces tumeurs présentent une instabilité chromosomique. D'autre part, le Syndrome du Lynch ou syndrome HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) est un cancer colorectal héréditaire sans polypose dont la survenue est liée à une mutation constitutionnelle sur les gènes de MMR (*Mismatch Repair*). Ces tumeurs présentent une instabilité génétique MSI (Figure I.1).

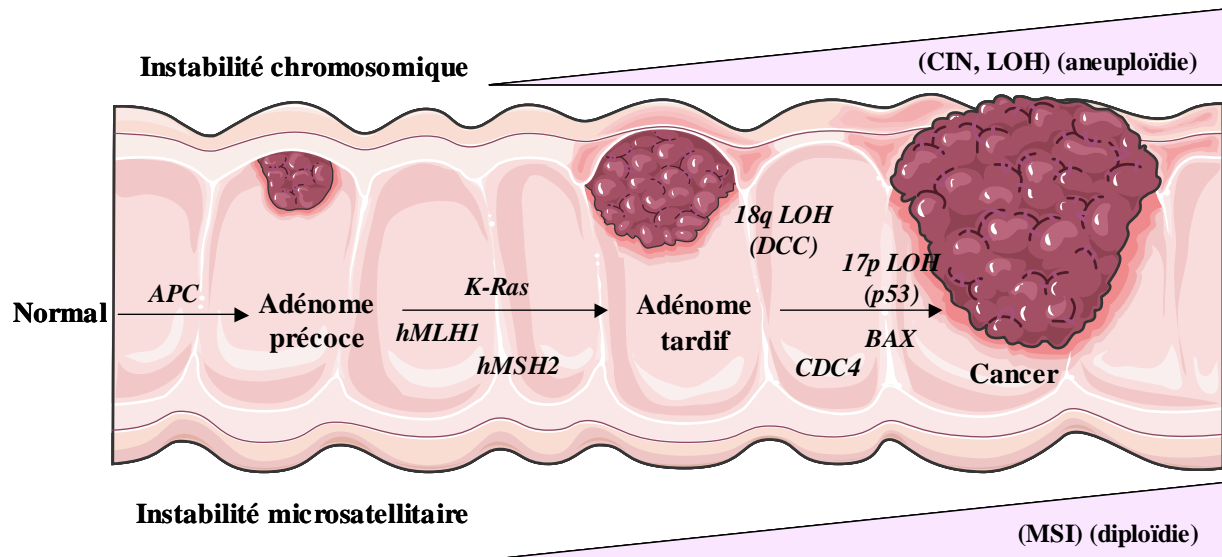


Fig. I.1. Modèle de cancérogenèse colorectale

En effet, des mutations des gènes critiques, comprenant des gènes suppresseurs de tumeur (APC, DCC), des oncogènes (K-Ras) et des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (hMLH1, hMSH2), conduisent à l'instabilité génétique, à une perte progressive de la différenciation et donc à une transformation maligne complète.

#### I.1.2.1. Instabilité chromosomique et les tumeurs LOH (Loss of Heterozygosity)/CIN (Chromosomal Instability)

L'instabilité chromosomique est le mécanisme moléculaire de cancérogenèse le plus fréquent dans le cancer colorectal : elle concerne 80 à 85 % des cancers colorectaux sporadiques (et même 90 % des cancers du côlon distal). Les cancers présentant un phénotype d'instabilité chromosomique sont appelés LOH+ (*Loss of Heterozygosity*) ou CIN (*Chromosomal Instability*). Il a été rapporté que dans 70 % de ces cas il y avait des pertes alléliques sur le bras courts des chromosomes 17p et 8p, et sur les bras longs des chromosomes 18q, 5q et 22q [Kern *et al.*, 1989 ; Vogelstein *et al.*, 1989]. Ces pertes alléliques sont associées à des mutations fréquentes des gènes suppresseurs des tumeurs TP53 et APC, localisées sur le bras court de chromosomes 17p et respectivement sur le bras long du



## CHAPITRE 1

chromosome 5q. Les altérations chromosomiques entraînent la perte de la fonction suppressive et, dans la plupart des cas, l'acquisition d'une fonction transformante.

Le gène de *TP53* est muté dans 40 % à 60 % des tumeurs cancéreuses, dans des stades tardifs de la cancérogenèse colique [Vogelstein *et al.*, 1988]. Par ailleurs, des études sur le rôle de p53 comme facteur pronostique ou comme facteur prédictif de la réponse ont rapporté des résultats contradictoires [Kikuchi-Yanoshita *et al.*, 1992 ; Russo *et al.*, 2005 ; Munro *et al.*, 2005]. En effet, la valeur pronostique de ce gène reste à confirmer.

Le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), dont les mutations germinales sont à l'origine de la polypose adénomateuse familiale, est situé sur le chromosome 5. La protéine APC intervient dans la dégradation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, un proto-oncogène impliqué dans l'adhérence cellulaire et la transduction du signal. L'inactivation d'APC est par ailleurs responsable d'instabilité chromosomique car favorisant la polyploïdisation [Konishi *et al.*, 1993].

Le gène *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) est localisé en 18q21.2, sur le bras long du chromosome 18. Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. L'absence ou l'inactivation de DCC par mutation ou délétion induirait une perte des propriétés adhésives des cellules tumorales favorisant leur croissance et leur dissémination. La perte allélique de DCC survient dans 47 % des lésions précancéreuses (adénomes avec dysplasie de haut degré) et dans 73 % des carcinomes. Elle semble de ce fait un événement tardif de la carcinogenèse colique, bien que son rôle précis reste difficile à déterminer.

Les gènes *SMAD2* et *SMAD4/DPC4* (des médiateurs de la signalisation du TGF $\beta$ ) se situent sur le même segment chromosomique que le gène du *DCC*. Ces gènes sont généralement délétés dans les cancers colorectaux [Veigl *et al.*, 1998 ; Kane *et al.*, 1997]. En conséquence, la transcription du TGF $\beta$  ne se fera pas et il y aura une croissance cellulaire sans inhibition. Cette croissance entraînera l'apparition de la tumeur. La mutation dans le gène codant pour la protéine SMAD4 peut jouer un rôle important dans la survenue du syndrome de la polypose juvénile familiale [Teniere *et al.*, 2002].

À l'exception de la perte des bras chromosomiques 5q, 8p, 17p, 18q et 22q et de l'aneuploïdie, reflet global de l'instabilité chromosomique, les mutations de l'oncogène *Kirsten-ras* (K-Ras) se trouvent parmi les altérations génétiques les plus fréquentes caractérisant les cancers colorectaux de phénotype LOH+.

Les protéines Ras (*Rat Sarcome*) sont des protéines G de 21 kDa qui ont pour fonction la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Ces protéines

## CHAPITRE 1

servent ainsi de lien entre les récepteurs membranaires et les protéines kinases intracytoplasmiques effectrices. Ras, localisée à la face interne de la membrane cytoplasmique, est capable d'échange entre le GTP et le GDP. En effet, les protéines Ras oscillent entre un état actif, où elles sont liées au GTP et un état inactif où elles sont liées à la guanosine diphosphate (GDP). L'activation des protéines Ras normales ou mutées survient lors du remplacement du GDP par le GTP. Cette réaction d'échange est catalysée par une protéine appartenant à la famille des protéines appelée GEF « Guanine nucleotide exchange factors ». Le retour à un état inactif des protéines Ras est provoqué par l'hydrolyse du GTP en GDP. Cette réaction est activée par les protéines GAP « GTPase activating proteins » [Colicelli *et al.*, 2004] (Figure I.2).

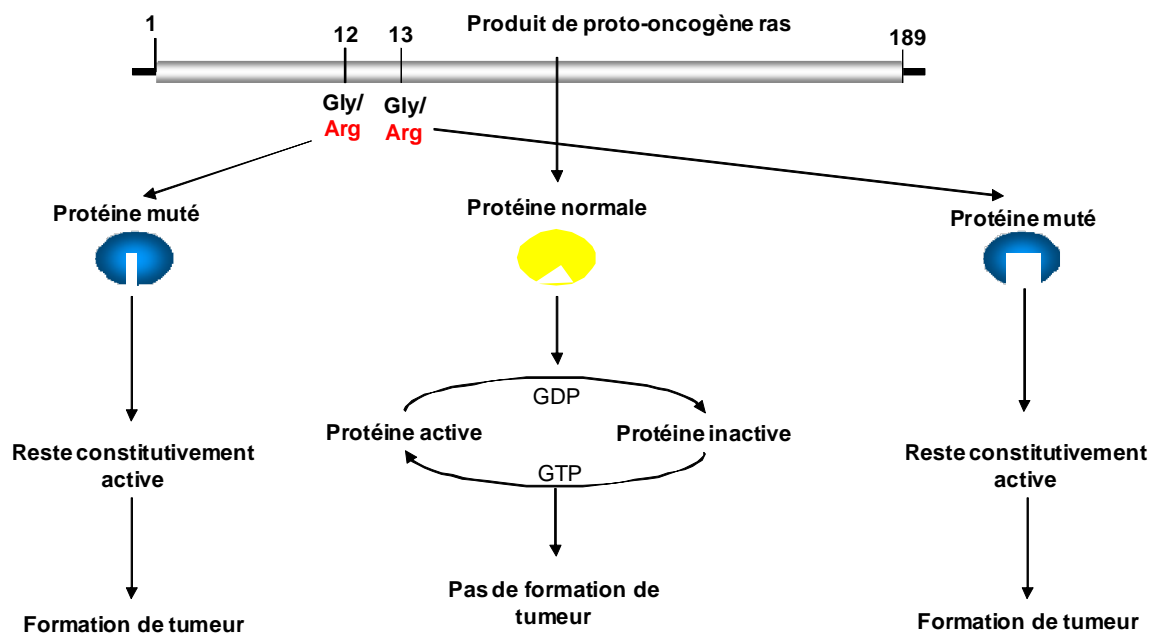


Fig. I.2. Processus d'activation du K-ras

Lorsque Ras est activée par un signal mitogénique via Grb2/SOS, elle active à son tour la voie des MAP kinase en induisant un changement conformationnel rendant Raf actif. La cascade d'activation des kinases qui en découle permet l'activation des différents facteurs de transcription de l'ADN (notamment c-myc et c-jun) (Figure I.3). Ces protéines contribuent également à la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

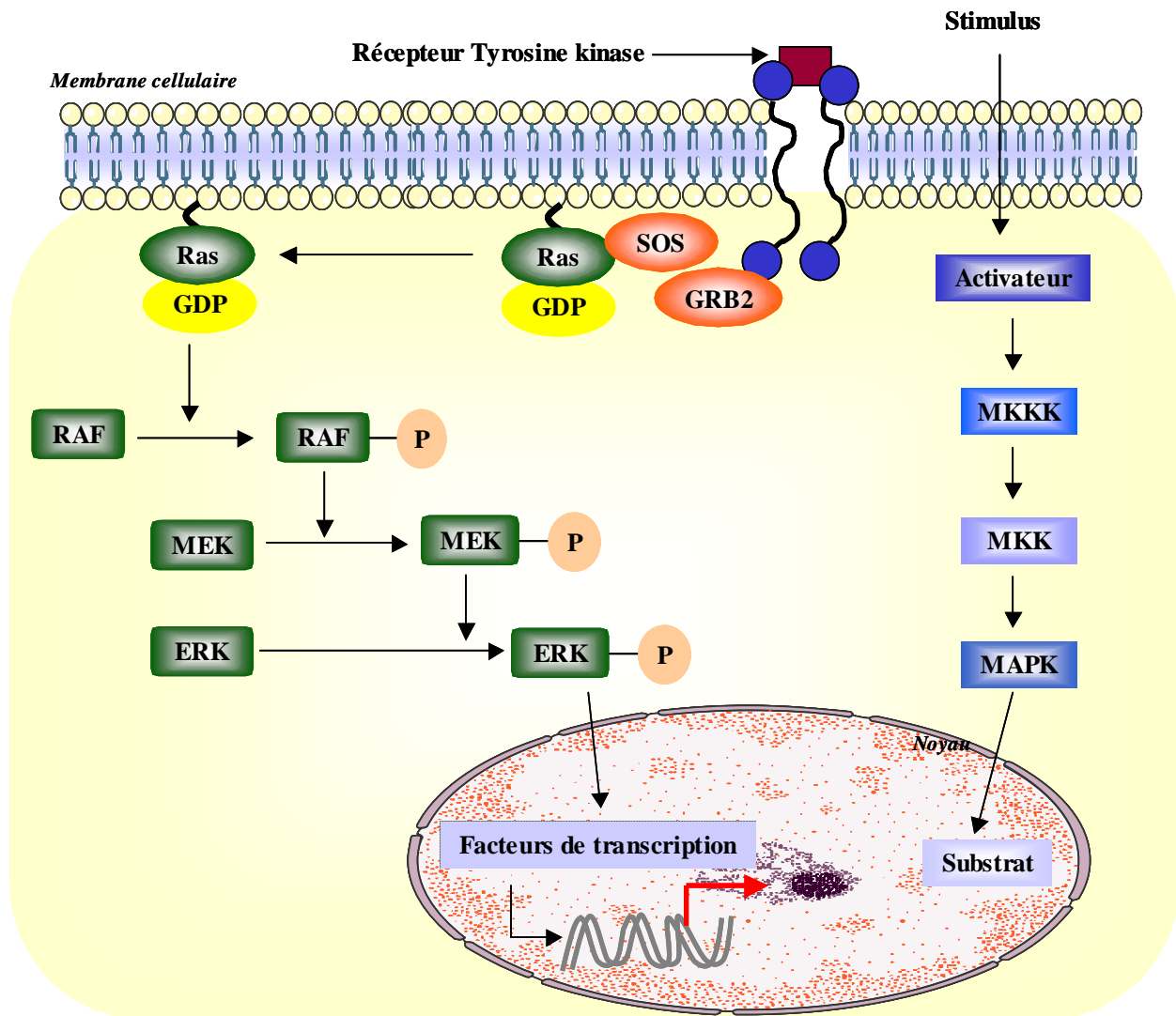


Fig. I.3. Voie de la protéine Ras

La famille des protéines Ras comprend 3 isoformes de Ras différentes : H-Ras, N-Ras, et K-Ras. A la différence de K-Ras, H-Ras et N-Ras possèdent un groupement palmitoyl permettant leur localisation dans l'appareil de Golgi. K-Ras, en revanche, est uniquement retrouvée sous la membrane plasmique [Choy *et al.*, 1999].

L'isoforme K-Ras est la plus exprimée et, il a été montré, qu'elle est activée d'une manière constitutive par la présence de mutations faux-sens des codons 12 ou 13 de l'exon 1 et 61 de l'exon 2. Ces mutations lui confèrent le pouvoir transformant [Vogelstein *et al.*, 1988 ; Cho *et al.*, 1992 ; Kikuchi-Yanoshita *et al.*, 1992]. En effet, la prévalence des mutations de l'oncogène K-Ras atteint 40 à 50 % des cancers colorectaux. Elles surviennent précocement au cours de la cancérogenèse colorectale et principalement (80 % des cas) au niveau du codon 12. Par exemple, RasG12V ne s'associe plus aux GAP, elle est donc liée à un GTP et donc reste active. Mais la valeur pronostique des mutations de K-Ras reste

controversée. Plusieurs études ont rapporté un mauvais pronostic en cas de mutations de K-Ras, notamment au niveau des codons 12 et 13, ceci indépendamment du stade tumoral [Andreyev *et al.*, 1998].

### **I.1.2.2. Instabilité microsatellitaire et les tumeurs MSI**

Les microsatellites sont composés par répétitions des séquences nucléotidiques courtes de 1 à 6 nucléotides. Elles peuvent se trouver aussi bien dans les régions codantes, que dans les régions non-codantes, étant beaucoup plus abondantes au sein de ces dernières [Ellegren *et al.*, 2004].

Environ 15 % à 20 % des cancers colorectaux présentent une instabilité des microsatellites (phénotype MSI). Généralement, cette instabilité est liée à un défaut de réparation des mésappariements. Ce défaut intervient suite à l'inactivation de certains gènes du système MMR (système de réparation des mésappariements de l'ADN) [Aaltonen *et al.*, 1994 ; Fishel *et al.*, 1993 ; Nicolaidis *et al.*, 1993], en particulier par hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1* (*human Mutant L Homologue 1*). En effet, dans la majorité des cas, les tumeurs MSI sont des formes sporadiques et la méthylation au niveau du promoteur de *hMLH1* est associée avec une diminution de l'expression de la protéine [Fleisher *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 1999 ; Toyota *et al.*, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 1999].

Contrairement à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, l'inactivation d'un gène du MMR n'intervient pas directement dans la transformation maligne, mais contribue à cette transformation en empêchant la correction des erreurs de réplication de l'ADN.

Des nombreux gènes régulateurs de la croissance (récepteur de type II du TGF $\beta$ , récepteur de l'IGFII), impliqués dans les voies du contrôle du cycle cellulaire (E2F4), des régulateurs de l'apoptose (Bax) et les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN sont la cible des mutations dans les tumeurs MSI [Markowitz *et al.*, 1995 ; Souza *et al.*, 1996 ; Souza *et al.*, 1997 ; Rampino *et al.*, 1997]. Le motif de la survenue des mutations au niveau de ces gènes est lié au fait qu'ils contiennent des séquences répétées mononucléotidiques dans les régions codantes (exons) ou dans les régions non-codantes (introns) de gènes [Duval *et al.*, 2002]. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations ne sont pas encore clairement démontrées.

### I.1.3. Traitements et chimiothérapies

Le choix du traitement dépend du stade et de la localisation du cancer. La chirurgie représente le principal traitement du cancer colorectal. L'intervention consiste en l'exérèse du segment de côlon concerné, avec des marges saines de côlon, associée à l'exérèse des vaisseaux et du mésocôlon contenant les canaux et les ganglions lymphatiques.

Cependant, dans la moitié des cas diagnostiqués tardivement, un cancer colorectal est localement avancé ou présente des métastases, rendant impossible l'exérèse totale [Lelong *et al.*, 2004]. La chimiothérapie est alors nécessaire.

En effet, chez ces patients qui ne peuvent pas bénéficier d'une chirurgie, une chimiothérapie néoadjuvante a pour but d'améliorer le contrôle local de la maladie et de faciliter l'acte chirurgical ultérieur.

En même temps, pour les patients qui ont déjà eu la chirurgie, la chimiothérapie adjuvante a pour rôle de compléter le traitement, réduisant ainsi les risques de récurrence afin d'améliorer la survie. Son efficacité est démontrée dans le cas du cancer du côlon métastatique. L'association 5-Fluorouracile (5-FU) et acide folinique a longtemps constitué le traitement de référence. Le taux de réponse clinique d'un cancer colorectal au 5-FU varie de 10 % à 30 % [Shah *et al.*, 2001]. Les effets thérapeutiques du 5-FU sont largement améliorés en modulant les doses ou en modifiant le protocole d'administration [Gamelin *et al.*, 2008 ; Capitain *et al.*, 2008]. En effet, au Centre Paul Papin une adaptation pharmacocinétique de doses a été proposée par Gamelin E. *et al.* Cette solution développée a démontré son intérêt en permettant d'obtenir des taux de réponses deux fois plus élevées qu'avec un schéma non adapté (35 vs 18%, p = 0,004), une meilleure survie médiane (16 vs 13 mois, p = NS) et ce sans augmentation des effets secondaires [Gamelin *et al.*, 1998].

De nouvelles molécules, comme l'Irinotécan et l'Oxaliplatine, on fait la preuve de leur efficacité particulièrement dans des protocoles de leur association avec le 5-FU : le protocole FOLFIRI (pour l'association de l'Irinotécan avec le 5-FU) et le protocole FOLFOX (pour l'association de l'Oxaliplatine avec le 5-FU). Ces protocoles chimiothérapeutiques ont permis l'augmentation du taux de réponse au traitement jusqu'à 35 % - 50 % et également de la survie globale et de la survie sans progression des patients. En effet, les résultats évaluant la séquence FOLFOX suivi par FOLFIRI en cas de progression sont les mêmes que pour une séquence FOLFIRI-FOLFOX comme l'étude GERCOR l'a démontré [Tournigand *et al.*, 2004]. La différence essentielle repose sur les profils de toxicités avec 25% de neutropénies de grade 3 – 4 pour le FOLFIRI, 44% de neutropénies et 34% de neuropathies de grade 2 ou

plus pour le FOLFOX (dont 20% persistantes sous FOLFIRI), ayant entraîné 36% d'arrêt de traitement. Par ailleurs, il a été montré que le taux de survie globale des patients augmente de façon significative avec l'utilisation d'Irinotécan et d'Oxaliplatine quelles que soient leur séquence et leur combinaison [Grothey *et al.*, 2005].

### **I.1.3.1. K-Ras et les thérapies « ciblées »**

Pour diminuer la mortalité et améliorer la qualité de vie des malades, de nouvelles thérapeutiques comme les thérapies ciblées (anti-angiogéniques, anti-EGFR) ont récemment été développées. Le nom de thérapies « ciblées » est dû au fait que leur action est concentrée particulièrement sur les cellules cancéreuses. Cela limite les dommages causés aux cellules normales du corps et réduit les effets secondaires. En pratique, les thérapies ciblées sont plus efficaces quand elles sont utilisées en association avec de la chimiothérapie pour les cancers colorectaux avancés. Les données les plus récentes indiquent d'une part que ces nouvelles thérapies ne sont dans leur grande majorité « que » des agents cytotoxiques quand elles sont utilisées en monothérapie et d'autre part qu'elles n'échappent pas aux mécanismes de résistance habituellement observés avec les autres traitements anticancéreux. Concernant les mécanismes de résistance, notamment pour les petites molécules inhibitrices, il a été observé que tout mécanisme d'oncogénèse activé ou réactivé en aval de la cible propre du médicament permettra à la cellule cancéreuse d'échapper à son action, rendant la thérapie partiellement, voire totalement inefficace. Par ailleurs, le coût de ces thérapies « intelligentes » est assez élevé et de plus, il a été montré par l'intermédiaire de plusieurs études, particulièrement pour les thérapies anti-EGFR, qu'elles ne sont pas efficaces quand les patients présentent des mutations de K-Ras. Le cas des mutations de l'oncogène K-Ras dans les cancers colorectaux est emblématique [Lièvre *et al.*, 2008], parce qu'il conditionne de façon quasi absolue la sensibilité aux agents capables de bloquer le récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) situé en amont de K-Ras dans les voies de signalisation qu'il active. Ainsi, le cetuximab (Erbix®) comme le panitumumab (Vectibix®) 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 mois ( $p = 0,0046$ ) pour le cetuximab, 12,3 semaines versus 7,3 pour le panitumumab dans la sous-population sans mutation du gène *K-Ras* [Jonker *et al.*, 2007 ; Van Cutsem *et al.*, 2007].

En conclusion, la nécessité d'une recherche du statut K-Ras reste indispensable, l'efficacité n'existant qu'en cas d'absence de mutation à ce niveau. Toutefois, même s'il apparaît désormais clair que les traitements « ciblées » sont d'autant plus efficaces s'ils visent

la voie principale d'activation transductionnelle de la cellule tumorale, il est toujours intéressant de considérer les voies secondaires car il existe de nombreuses interactions entre ces voies et par conséquent des risques d'échappement thérapeutique.

### ***1.2. La pharmacogénétique des cytotoxiques « classiques » utilisés dans le cancer colorectal métastatique***

Le terme de « pharmacogénétique » a été proposé dès 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 les patients présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase [Beutler *et al.*, 1993]. Depuis, la pharmacogénétique joue un rôle marquant dans la recherche des facteurs génétiques liés à des anomalies de réponse aux médicaments.

Les traitements des cancers colorectaux ont connu des avancées significatives ces dernières années, mais les patients répondent différemment à des thérapies identiques, tant sur le plan pharmacologique (efficacité recherchée) que sur le plan des toxicités (effets indésirables). Les polymorphismes génétiques sont l'une des causes majeures de ces réponses individuelles aux médicaments associés avec des conséquences parfois très graves. Dans ce contexte, le but de la pharmacogénétique a été de chercher de marqueurs génétiques qui peuvent être à la fois des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement et des marqueurs pronostiques, afin de déterminer l'agressivité de la maladie et la probabilité de récurrence après chirurgie. Cependant, même si un grand nombre de marqueurs moléculaires ont été décrit (comme UGT1A1, DPD, K-Ras ou TS), seul K-Ras est utilisé actuellement en routine clinique comme critère d'administration d'anticorps anti-EGFR.

Toutefois, avec les progrès dans la compréhension des voies moléculaires impliquées dans l'apoptose, la réparation de l'ADN, les mécanismes de réplication et de la cancérogenèse, ceux-ci confirment que la croissance des tumeurs est un processus complexe, résultant des interactions de plusieurs voies moléculaires. Ce processus ne peut pas donc être caractérisé par un seul marqueur. L'utilisation fréquente de combinaisons de molécules en chimiothérapie rend de plus en plus nécessaire l'affinage sur des rationnels biologiques.

Dans le contexte plus particulier des agents thérapeutiques « classiques » (notamment le 5-FU, l'Irinotécan et l'Oxaliplatine), l'identification et la validation de marqueurs prédictifs de toxicités et de résistances spécifiques aux différentes associations de ces molécules, aidera le clinicien à réaliser une « individualisation thérapeutique » en fonction du profil génotypique de chaque patient, en réduisant ainsi le risque des toxicités ou de non-réponse au traitement.

## CHAPITRE 1

Des généralités sur ces médicaments, leurs métabolismes, ainsi que des facteurs pharmacogénétiques pouvant expliquer l'apparition des toxicités et des résistances au traitement, seront présentés dans les paragraphes suivants.

### **I.2.1. 5 - Fluorouracile (5-FU)**

Le 5-fluorouracile (5-FU) est le médicament de référence utilisé dans le traitement du cancer colorectal.

#### **I.2.1.1. Présentation de la molécule**

##### **Généralités**

Le 5-fluorouracile (5-FU) est un médicament utilisé depuis 50 ans qui reste encore très largement utilisé, notamment comme traitement adjuvant dans les cancers gastro-intestinaux associé à l'acide folinique et à d'autres thérapies cytotoxiques ou ciblés dans le cadre de différents protocoles thérapeutiques.

##### **Structure et caractéristiques biochimiques**

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

##### **Pharmacocinétique**

Le 5-FU est administré par voie intraveineuse, la demi-vie après injection intraveineuse en bolus est très courte (entre 8 et 22 minutes). Le volume de distribution est, par contre, très large (14-54 litres) avec une clairance se situant entre 0,5 et 2 l/min, non linéaire et variant avec la dose administrée [Diasio *et al.*, 1989]. Le métabolisme est essentiellement hépatique (95%), l'élimination urinaire restant faible : 5 à 10% de la dose administrée.

Cette molécule est captée préférentiellement par les tissus à croissance et à renouvellement rapide, comme les cellules tumorales, la moelle osseuse et la muqueuse intestinale.

#### **I.2.1.2. Métabolisme du 5-FU**

Dans les cellules, le 5-FU en lui-même est inactif – c'est une prodrogue. Le 5-FU présente un métabolisme relativement complexe dont l'équilibre entre les différentes voies



joue un rôle très important dans l'efficacité du traitement et la survenue d'effets indésirables qui peuvent être très graves.

Après son entrée dans la cellule, le 5-FU suit une voie catabolique et une voie anabolique. Ces différentes voies d'action du 5-FU sont schématisées dans la figure I.4.

La voie catabolique entraîne la formation de composés inactifs ; elle est responsable de l'élimination de 60 % à 90 % de la dose administrée. L'enzyme responsable du catabolisme du 5-FU est la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) qui permet la réduction du 5-FU en 5-fluoro-5,6-dihydrouracile (FUH<sub>2</sub>), le métabolite inactif. Cette enzyme intervient aussi dans la transformation des bases pyrimidiques naturelles (uracile et thymine) en leurs dérivés dihydrogénés (dihydrouracile -UH<sub>2</sub>- et dihydrothymine). La deuxième étape du catabolisme fait intervenir la dihydropyrimidinase pour former l'acide 5-flourouréidopropionique (FUPA), qui sera métabolisé en α-fluoro-βalanine (FBA) sous l'action de l'uréidopropionase.

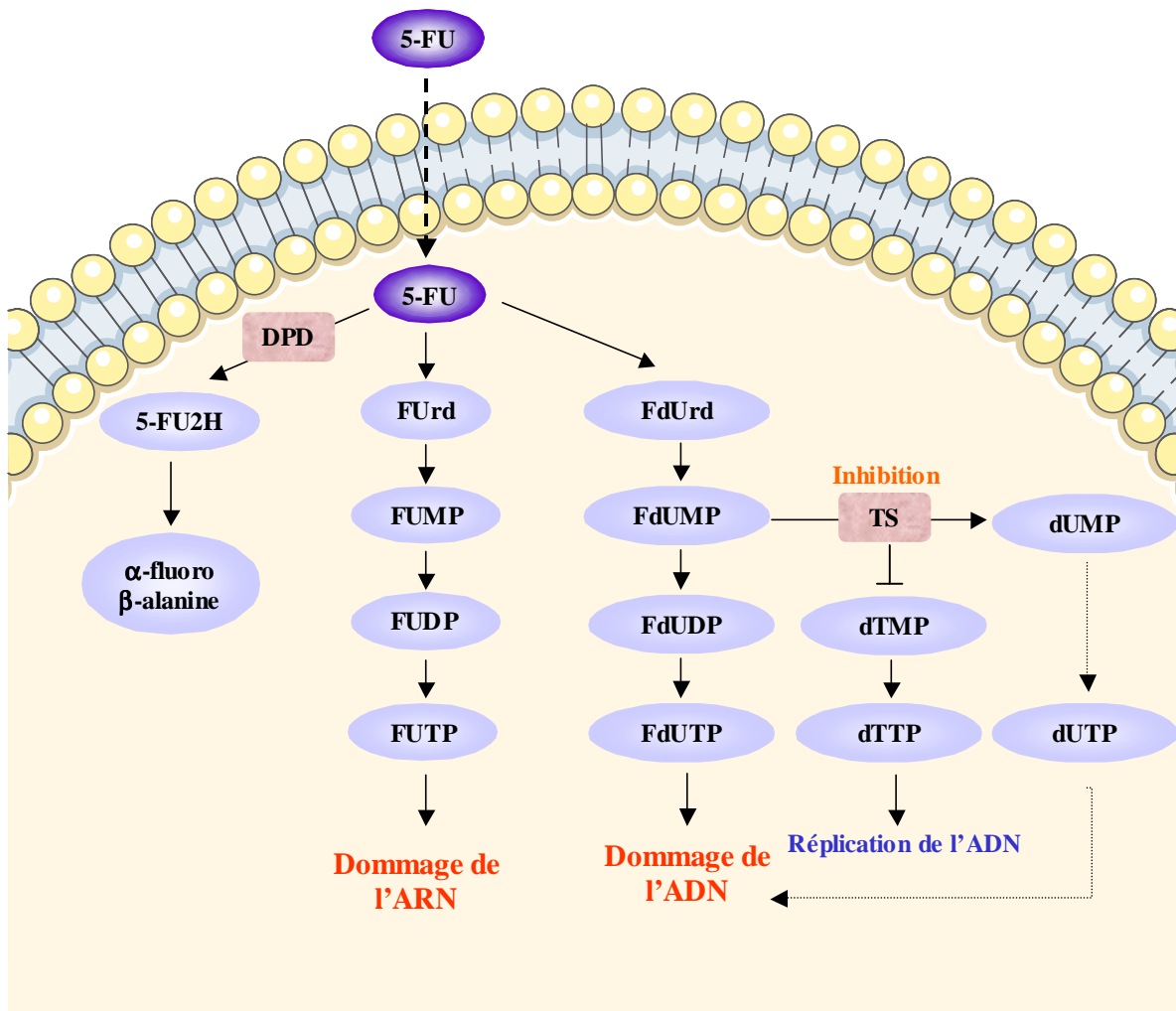


Fig. I.4. Différentes voies d'action du 5-FU

## CHAPITRE 1

Généralement, les produits de ce catabolisme ne possèdent pas d'activité cytotoxique, mais certains métabolites hépatiques du 5-FUH<sub>2</sub> seraient néanmoins hépatotoxiques [Aparicio *et al.*, 2002].

La voie anabolique est plus complexe : elle conduit, à la suite d'une succession de réactions enzymatiques, à la formation des métabolites actifs – FdUMP (fluorodéoxyuridine monophosphate), FdUTP (fluorodeoxyuridine triphosphate), et FUTP (fluorouridine triphosphate) - responsables de l'effet cytotoxique du 5-FU. En même temps, seule 20 % du 5-FU administré est normalement disponibles pour la voie anabolique, nécessaire à son action cytotoxique. Contrairement à la voie catabolique, l'anabolisme du 5-FU peut avoir lieu sur trois voies essentielles.

Une voie principale via son métabolite FdUMP qui joue un rôle majeur dans la cytotoxicité du 5-FU par l'inhibition de la thymidylate synthase (TS).

Dans des conditions normales, la TS catalyse la conversion intracellulaire de dUMP, en présence de 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (CH<sub>2</sub>THF), en 2'-désoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP). Cette réaction de méthylation réductive représente la seule source *de novo* de thymidylate qui est nécessaire pour la réplication ainsi que pour la réparation de l'ADN [Longley *et al.*, 2003]. La concentration intracellulaire de CH<sub>2</sub>THF est contrôlée par l'enzyme méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), qui transforme le CH<sub>2</sub>THF en 5-méthyl-tétrahydrofolate de manière irréversible.

La TS est une protéine dimérique et les deux sous-unités qu'elle possède présentent des sites de fixation pour CH<sub>2</sub>THF et des sites NBS (Nucleotide Binding Site). Le 5FdUMP se fixe sur les sites NBS - bloquant ainsi la fixation du substrat normal (dUMP) [Longley *et al.*, 2003 ; Santi *et al.*, 1974] - et forme un complexe ternaire inactif avec la TS et CH<sub>2</sub>THF [Danenbergh *et al.*, 1977]. Donc, l'inhibition de la TS sera responsable de l'inhibition de la synthèse de dTMP (désoxythymidine monophosphate) (Figure I.5). La déplétion en dTMP sera par la suite responsable d'une déplétion en dTTP. Ce déséquilibre dans la balance des désoxynucléotides perturbera les processus de synthèse et de réparation de l'ADN.

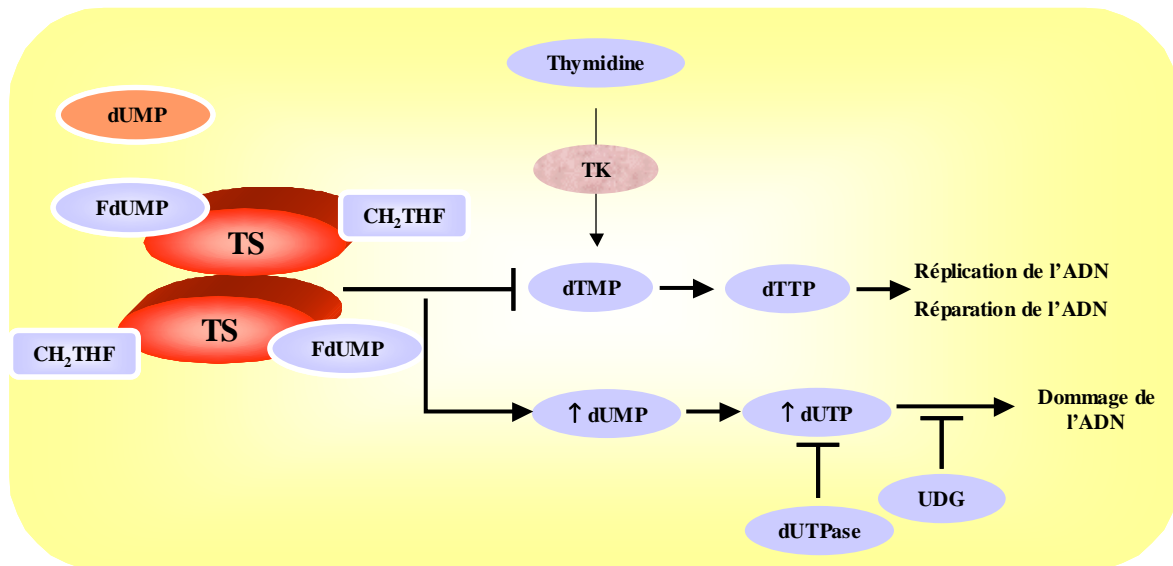


Fig. I.5. Mécanisme d'inactivation de la TS par 5-FU et ses conséquences [d'après Longley *et al.*, 2003]

L'inhibition de la TS est limitée à la phase S du cycle cellulaire, ce qui ne concerne qu'une faible proportion des cellules cancéreuses. L'activité du 5-FU passe aussi par le recrutement d'autres mécanismes de cytotoxicité indépendants du cycle cellulaire et notamment par l'action sur la synthèse de l'ARN [Thomas *et al.*, 1998].

Dans une deuxième étape, l'incorporation du métabolite triphosphate 5-FUTP (5-fluorouridine triphosphate) dans l'ARN au cours des mécanismes de transcription aboutit à des altérations fonctionnelles comme l'atteinte des processus de maturation et de modifications post-transcriptionnelles. L'incorporation dans des différents types d'ARN (ribosomal, de transfert et messager) est potentiellement liée aux toxicités observées, notamment au niveau digestif [Parker *et al.*, 1990]. Ce mécanisme est plus particulièrement en cause dans les schémas d'administration de type bolus.

Finalement, la troisième voie est représentée par l'incorporation de 5-FdUTP (5-Fluorodésoxyuridine triphosphate) dans l'ADN, ce qui provoque sa fragmentation [Ingraham *et al.*, 1982]. En effet, l'inhibition de la TS aura comme résultat une accumulation de dUMP qui conduit à une accumulation de dUTP. Le ratio dUTP/dUMP est maintenu bas par la dUTPase. Lorsque la concentration de dUMP est trop élevée, la concentration en dUTP augmente également. Dans ce cas, la dUTPase ne peut plus convertir le dUTP en dUMP suffisamment vite (Figure I.5). L'uracile n'étant pas une base « normale » de l'ADN, il existe des mécanismes de réparation qui permettent de l'éliminer et de la remplacer par la thymine.

Lorsque le niveau de dUTP est déséquilibré au point de provoquer une incorporation trop importante d'uracile, la réparation du génome ne se produit plus provoquant ainsi la fragmentation de l'ADN et donc la mort cellulaire [Van Triest *et al.*, 2000].

**I.2.1.3. Facteurs génétiques associés aux toxicités au 5-FU**

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

La chimiothérapie anticancéreuse à base du 5-FU présente de nombreuses toxicités qu'on peut classer selon le tableau I.1 :

<i>Toxicités</i>	<i>Symptômes</i>
<i>Toxicités hématologiques</i>	Anémie
	Thrombopénie
	Leucopénie
<i>Troubles cutanées</i>	Syndrome « Mains et Pieds »
<i>Toxicités cardiaques</i>	Insuffisance cardiaque
	Infarctus aigu du myocarde
<i>Troubles digestifs</i>	Vomissements
	Nausée
	Diarrhée
<i>Atteintes des muqueuses</i>	Mucite
	Stomatite
	Gingivito-stomatite

**Tab. I.1. Toxicités au 5-FU**

Comme indiqué dans le tableau I.1, la plupart des épisodes de toxicité dus au 5-FU surviennent principalement au niveau des tissus à renouvellement rapides, comme la moelle osseuse (toxicité hématologique : neutropénie, thrombopénie, anémie), les muqueuses de l'appareil digestif (nausées et vomissements, mucites, ulcérations de la muqueuse oropharyngée, diarrhées sévères) et les cellules de la peau (alopécies, dermatites, érythrodermie palmo-plantaire ou syndrome « mains – pieds ») [Diasio *et al.*, 1988]. Une toxicité du système nerveux central peut également parfois apparaître.

L'enzyme le plus souvent associée à l'apparition de ces toxicités est la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD).

### ***1.2.1.3.1. Dihydropyrimidine Deshydrogénase (DPD)***

La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est l'enzyme initiale et limitante du catabolisme de cette molécule. Cette enzyme ubiquitaire est un facteur majeur de la biodisponibilité du 5-FU, puisque plus de 80 % de la molécule administrée sont catabolisés en 5-fluoro-5,6-dihydrofluorouracile (FUH<sub>2</sub>) inactif. Toutefois, l'activité de cette enzyme est caractérisée par une grande variabilité interindividuelle agissant sur le métabolisme de 5-FU et de ses paramètres cinétiques [Fleming *et al.*, 1992]. De plus, de nombreux déficits d'activité de la DPD ont été rapportés dans la littérature [Haris *et al.*, 1991a ; Tuchman *et al.*, 1985]. La fréquence des sujets déficitaires a été évaluée entre 3 % et 5 % dans la population générale [Lu *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 1993]. Cependant les mécanismes régulant l'expression de ce gène sont mal connus et peu évalués en termes d'implications dans la toxicité. Des mutations peuvent être à l'origine d'une augmentation ou d'une diminution de l'activité enzymatique. Aujourd'hui, ont été répertoriées une multitude de mutations ponctuelles (ou SNP) sur le gène codant pour la *DPD* (situé sur le chromosome 1p22).

Il a été montré qu'un déficit partiel (chez les malades possédant un génotype hétérozygote) ou total (chez les malades possédant un génotype homozygote muté) en *DPD* engendre chez des patients traités par du 5-FU des toxicités souvent sévères, voire mortelles [Gamelin *et al.*, 2005].

La mutation délétère la plus étudiée est localisée sur le site d'épissage près de l'exon 14 (IVS14+1G>A) [van Kuilenburg *et al.*, 2001]. Elle consiste en la substitution d'une guanine par une adénine, et a comme conséquence la délétion complète de l'exon 14 lors de l'épissage de l'ARN pré-messager [van Kuilenburg *et al.*, 2004] (Figure I.6). Cette mutation est présente chez près de la moitié des patients déficitaires et chez près de 30 % des patients ayant développé une toxicité grave [van Kuilenburg *et al.*, 2001 ; van Kuilenburg *et al.*, 2004].

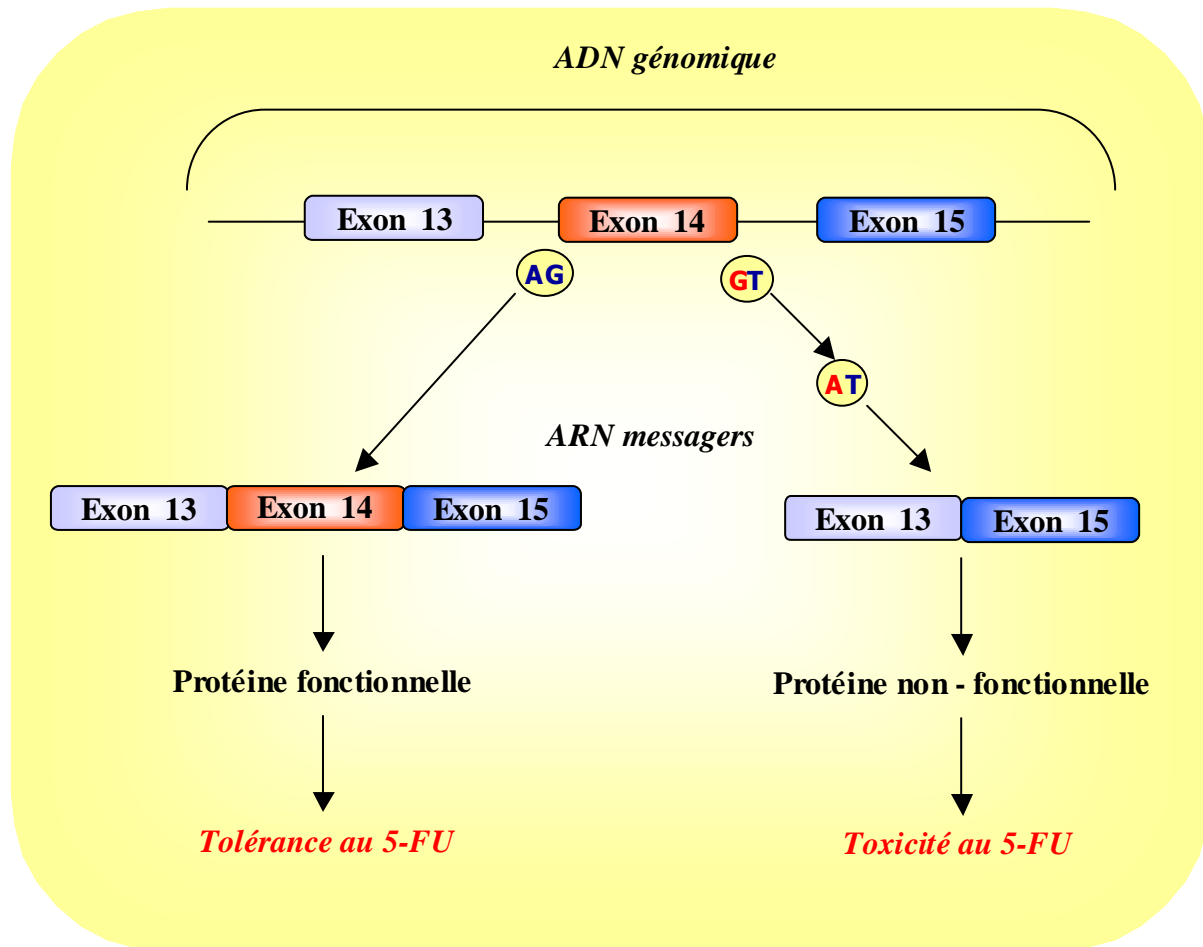


Fig. I.6. Mécanisme de retentissement du SNP de l'exon 14 sur la structure et l'activité de l'enzyme.

D'autres mutations délétères ont été mises en évidence. Il s'agit des mutations dans les régions codantes du gène de la *DPD* et dans la région du promoteur pouvant altérer l'expression du gène. La plupart des mutations ont été décrites suite à leur impact sur l'apparition des manifestations toxiques au traitement. Malgré ces informations, leur fréquence et leur implication exacte dans l'activité et le fonctionnement de la *DPD* restent malheureusement encore mal connues [Collie-Duguid *et al.*, 2000]. En raison du grand nombre de patients qui reçoivent une chimiothérapie à base du 5-FU, le dépistage des patients susceptibles de développer une toxicité importante devient une priorité dans le domaine de la santé publique.

Dans le but de dépister les patients déficitaires tout en offrant la possibilité d'avoir une idée pré-thérapeutique de la dose optimale visée chez le patient, au centre Paul Papin plusieurs approches sont développées :

- 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

## CHAPITRE 1

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.

- *Calcul du rapport plasmatique  $UH_2/U$*  (l'uracile étant l'un des substrats naturels de la DPD et  $UH_2$  son métabolite). Cette approche est plus adaptée à des techniques de routine en laboratoire et mieux corrélée à la clairance plasmatique du 5-FU.

### **1.2.1.4. Facteurs génétiques modulant la réponse au 5-FU**

Bien que le 5-FU soit l'agent anticancéreux de référence en chimiothérapie des cancers colorectaux, son efficacité dans des formes avancées est limitée par une résistance spontanée (près de 1 patient sur 2) ou secondaire (presque tous les cas). La résistance au 5-FU est le plus souvent causée par des altérations de son métabolisme.

Le mécanisme majeur de la résistance dans les carcinomes métastatiques est du à une altération de l'anabolisme du 5-FU qui peut avoir comme conséquence la faible formation du FdUMP (fluorodéoxyuridine monophosphate).

Un autre mécanisme de la résistance à cette molécule dans les tumeurs coliques peut être du à une altération de son catabolisme.

Les gènes le plus souvent décrites comme étant responsables de la résistance au traitement avec du 5-FU, en plus de la DPD, sont la TS et le MTHFR.

#### **1.2.1.4.1. Thymidylate synthase (TS)**

La TS intervient dans une étape limitant de la biosynthèse de l'ADN catalysant la méthylation réductive du dUMP en dTMP [Kundu *et al.*, 1974]. Elle devient ainsi un facteur clé de la croissance cellulaire.

L'inhibition de l'activité de cette enzyme est une des principales cibles du 5-FU et de son activité anticancéreuse [Johnson *et al.*, 1992 ; Leichman *et al.*, 1997 ; Danenberg *et al.*, 1977]. De ce fait, la TS est l'un des marqueurs dont les multiples aspects de sa régulation ont été le plus évalués dans la réponse à la chimiothérapie – tant *in vitro* comme *in vivo* - notamment pour expliquer la sensibilité ou la résistance au 5-FU et moduler son utilisation.

### **Polymorphismes du gène TS modifiant la réponse individuelle au 5-FU**

Le contrôle des mécanismes de régulation de l'expression du gène de la TS est complexe et implique différentes étapes régulatrices à partir du niveau transcriptionnel jusqu'au niveau post-translationnel [Chu *et al.*, 1991].

Le gène de la *TS* est situé sur le chromosome 18. Il a une longueur de 18 kpb et il est constitué de sept exons et de six introns [Kaneda *et al.*, 1990] (Figure I.7).

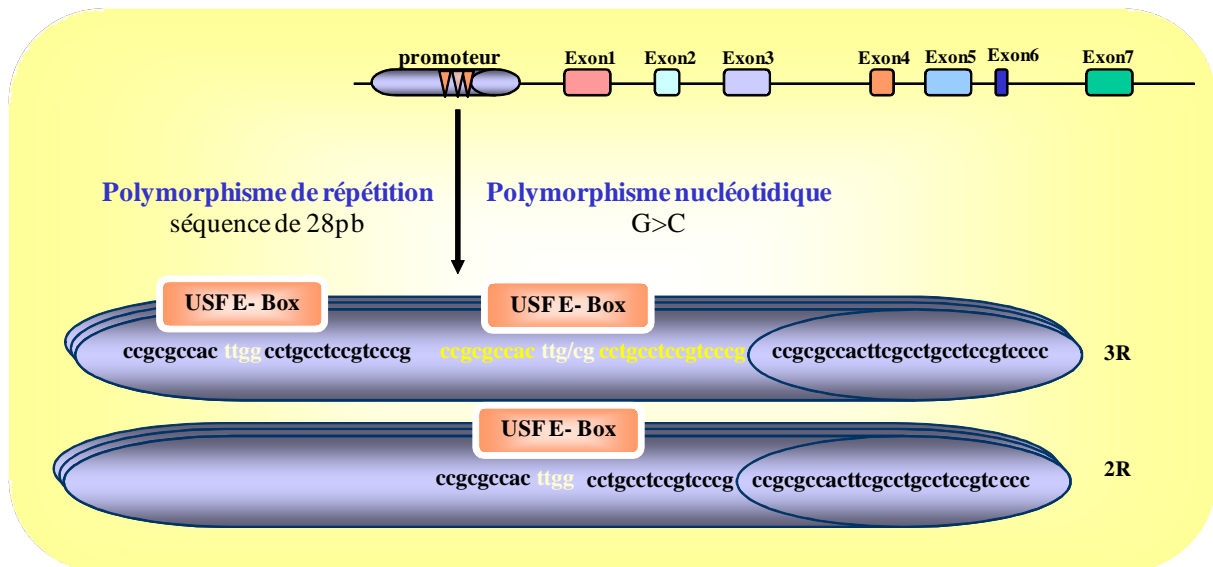


Fig. I.7. Structure du gène de la *TS* avec deux types de SNP au niveau de promoteur

L'expression de la *TS* est partiellement contrôlée par un certain nombre de polymorphismes au sein du gène. Ces polymorphismes ne sont pas encore clairement évalués en termes cliniques. Parmi eux, trois ont été étudiés chez des patients, en relation avec la réponse individuelle au 5-FU :

#### 1. Polymorphisme 2R/3R dans la région 5'UTR du gène de la *TS*

La *TS* a été cloné partir d'une librairie d'ADNc provenant de fibroblastes humains [Takeishi *et al.*, 1985]. Il a été observé que le gène de la *TS* possède une caractéristique structurale unique au niveau de la région 5'UTR. Cette région a un contenu de 80% de CG et contient aussi un polymorphisme de répétition ou « R » d'une séquence de 28 pb (TSER, *Thymidylate Synthase Enhancer Region*) [Horie *et al.*, 1995]. Les répétitions possèdent une séquence CGCCGCG, et par conséquent cette région peut former 3 structures secondaires interchangeables, dont chacune contient une structure tige-boucle constituée par l'association de 2 séquences « CGCCGCG » (Figure I.7). Au niveau de la TSER (*Thymidylate Synthase Enhancer Region*) deux, trois, quatre, cinq ou neuf copies de la répétition de 28pb ont été décrites. Dans la plupart des populations étudiées TSER\*2 (soit 2R) et TSER\*3 (soit 3R) sont les allèles les plus fréquentes [Kaneda *et al.*, 1987 ; Horie *et al.*, 1995 ; Marsh *et al.*, 2000]. Les populations caucasiennes possèdent exclusivement les allèles 2R et 3R, alors que des répétitions multiples (4R, 5R, 9R) ont été trouvées dans les populations asiatiques et africaines,



## CHAPITRE 1

sans que leur conséquence fonctionnelle sur le niveau d'expression de TS n'ait été actuellement déterminée [Kawakami *et al.*, 2001 ; Marsh *et al.*, 1999].

Plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence qu'une augmentation du nombre des répétitions est responsable d'une augmentation de l'expression du gène de la TS et ainsi de l'activité de l'enzyme [Kawakami *et al.*, 1999 ; Horie *et al.*, 1995]. Ces résultats ont été confirmés également *in vivo* par différents chercheurs qui ont révélé que ce polymorphisme était susceptible de moduler l'expression et l'efficacité de traduction des ARNm de TS [Kawakami *et al.*, 2001 ; Pullarkat *et al.*, 2001]. Pullarkat *et al.* ont montré que les patients homozygotes 3R/3R ont des taux d'ARNm de TS 3,6 fois plus élevés dans les métastases de cancer colorectal comparés aux homozygotes 2R/2R, les hétérozygotes 2R/3R ayant des taux intermédiaires [Pullarkat *et al.*, 2001]. Contrairement aux résultats précédents, une étude rétrospective a rapporté des taux similaires d'ARNm de la TS, quel que soit le génotype. En revanche, des quantités de protéine plus élevées chez les sujets 3R/3R par rapport aux sujets 2R/3R et 2R/2R ont été constatées [Kawakami *et al.*, 2001].

Les analyses cliniques du polymorphisme 2R/3R chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique recevant une chimiothérapie à base de 5-FU ont mis en évidence que ce polymorphisme était prédictif de la sensibilité au traitement. Les résultats d'une étude de 2001 ont montré une différence significative de la réponse des patients traités par 5-FU pour un cancer colorectal, avec 9 % des répondeurs dans le groupe des patients homozygote 3R/3R, 15 % des répondeurs parmi les hétérozygotes 2R/3R et 50 % des répondeurs parmi les homozygotes 2R/2R [Pullarkat *et al.*, 2001]. Ces résultats ont été confirmés aussi dans d'autres travaux de recherche avec le 5-FU seul [Kawakami *et al.*, 1999] ou avec le 5-FU associé à l'Oxaliplatine [Shirota *et al.*, 2001].

Dans une étude récente réalisée chez des patients recevant du 5-FU seul ou en association à l'Oxaliplatine ou à l'Irinotécan, en situation adjuvante ou palliative, aucune relation n'était trouvée entre le polymorphisme 2R/3R et la réponse tumorale, alors que la sévérité de la toxicité du traitement augmentait avec le nombre d'allèles 2R [Lecomte *et al.*, 2004]. En plus de son caractère prédictif potentiel de la réponse au 5-FU, ce polymorphisme est lié à la toxicité à ce traitement. Les patients homozygotes 3R/3R s'avèrent moins exposés aux toxicités du 5-FU [Pullarkat *et al.*, 2001]. En revanche, le génotype 2R/2R est associé de façon significative à une toxicité au 5-FU par rapport au génotype 3R/3R [Lecomte *et al.*, 2004 ; Pullarkat *et al.*, 2001]. Cette différence pourrait être liée au fait que le niveau d'expression élevé de TS chez les homozygotes 3R/3R conduit à une inhibition moins efficace.

2. Polymorphisme simple nucléotide G→C dans la seconde répétition en tandem de la région 5'UTR du gène TS.

Mandola *et al* ont identifié un SNP G→C localisé dans le promoteur du gène TS, au niveau du 12ème nucléotide de la seconde répétition en tandem de 28 pb de l'allèle 3R, définissant les allèles 3C et 3G. Cette substitution polymorphique modifie un résidu critique dans le site de fixation (USF E-box) pour un facteur de transcription USF-1 (*Upstream Stimulatory Factor*) altérant ainsi l'activité transcriptionnelle du gène de la TS [Kawakami *et al.*, 2003 ; Mandola *et al.*, 2003] (Figure I.7).

Les porteurs d'une allèle G ont un niveau d'expression de gène de 3 à 4 fois supérieure à ceux porteurs d'une allèles C, soit en raison d'une activité de transcription augmentée [Mandola *et al.*, 2003], soit à cause d'une meilleure efficacité de traduction de l'allèle 3G par rapport aux autres [Kawakami *et al.*, 2003]. Dans une étude récente sur des patients atteints de cancer colorectal, les patients homozygotes 3G/3G ont présenté un taux d'ARNm de la TS beaucoup plus important par rapport aux patients porteurs d'un allèle C. Ces résultats confirment l'association entre le polymorphisme du nucléotide G→C et l'expression de l'ARNm de TS chez des patients atteints de cancer colorectal [Morganti *et al.*, 2005].

Des modèles différents d'hétéroduplex ont été dégagés en se basant sur les résultats sous-nommés. Cette observation donne lieu à une nouvelle répartition des patients selon une expression prédictive de la TS dite « haute » ou « basse » sur des critères purement génétiques [Kawakami *et al.*, 2003] (Tableau I.2).

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

Tab. I.2. Expression prévisible de la TS selon la combinaison de la mutation G→C et du polymorphisme

Ces résultats permettent, du moins en partie, d'expliquer pourquoi certains patients de génotype 3R/3R avaient un faible niveau d'expression de la TS et une bonne réponse à la chimiothérapie par 5-FU. Bien que ces données liant le polymorphisme de la TS et le niveau d'expression de son ARNm soient convaincantes, l'impact possible de ces variations génétiques sur d'autres mécanismes doit aussi être analysé. En contradiction avec ces résultats, Kawakami et d'autres chercheurs ont démontré que le polymorphisme 2R/3R, ainsi

que le polymorphisme G→C de l'allèle 3R, pouvaient être liés à des modifications de l'efficacité de traduction de la TS [Kawakami *et al.*, 2001 ; Kawakami *et al.*, 2002 ; Mandola *et al.*, 2003]. Avec cette approche, il a été conclu que plus le niveau d'expression de la TS était bas, meilleurs étaient la réponse et le pronostic [Kawakami *et al.*, 2003 ; Marcuello *et al.*, 2004a], ou que le génotype n'influçait pas significativement la réponse au 5-FU [Lecomte *et al.*, 2004 ; Morganti *et al.*, 2005].

### *3. Polymorphisme résultant de la délétion d'une séquence de 6 pb de la région 3'UTR du gène de la TS*

L'allèle portant la délétion est présente chez 27 % des caucasiens [Ulrich *et al.*, 2000 ; Mandola *et al.*, 2004], avec de grandes variations inter-ethniques, associé à une diminution de stabilité la structure secondaire ou l'expression de l'ARNm de la TS *in vitro* et de l'expression de la TS intratumoral [Pullmann *et al.*, 2006 ; Schaaf *et al.*, 2002].

Certaines études ont montré une association entre cette délétion de 6 pb et une moins bonne réponse à une chimiothérapie à base de 5-FU dans des cancers colorectaux [McLeod *et al.*, 2003]. Par contre, d'autres équipes ont mis en évidence une association entre un faible niveau d'expression de la TS et une réponse clinique favorable au 5-FU [Farrugia *et al.*, 2003 ; Leichman *et al.*, 1997 ; Salonga *et al.*, 2000 ; Shirota *et al.*, 2001].

D'une façon générale, pour préciser de quelle manière ce polymorphisme altère l'expression de TS, des analyses complémentaires sont nécessaires.

Pour mieux comprendre son implication dans la sensibilité de la réponse à une thérapie à base de 5-FU, il est nécessaire de découvrir l'ensemble des facteurs susceptibles de moduler son activité. Les résultats discordants rapportés dans la littérature, font la preuve de la nécessité d'établir la valeur pronostique des deux principaux polymorphismes du gène de la TS sur la réponse au 5-FU et la survie de patients traités pour un cancer colorectal métastatique.

#### ***1.2.1.4.2. Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)***

Un niveau élevé de l'expression de la TS n'est pas suffisant pour prédire la réponse au 5-FU. Un certain nombre de patients présentant un faible niveau d'expression de la TS n'ont pas répondu à une thérapie avec du 5-FU. Par conséquent, il est possible que pour ces patients d'autres enzymes du métabolisme expliquent les phénomènes de résistance à ce médicament. La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est considérée comme un candidat important pour expliquer les variations des réponses au traitement.

## CHAPITRE 1

La MTHFR est essentielle dans le cycle des folates et dans la synthèse de la thymidine. Cette enzyme assure le contrôle de l'équilibre entre la méthylation et la synthèse de l'ADN. La MTHFR intervient dans la conversion de 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10 MeTHF) en 5-méthyl tétrahydrofolate (5-méthyl THF), la forme circulante majeure des folates, qui sert alors de substrat pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Cette réaction se réalise grâce à la méthionine synthase qui a la vitamine B12 comme cofacteur. La méthionine permet la biosynthèse *de novo* de S-adenosyl-méthionine (SAM) qui est le principal donneur de radicaux méthyl chez l'homme. La MTHFR est inhibée par la SAM.

Par contre, le 5,10-MeTHF est nécessaire pour la conversion du dUMP (désoxyuridylate monophosphate) en dTMP (déoxythymidylate monophosphate) via la thymidylate synthase, participant ainsi à la synthèse des pyrimidines (ADN). La déoxythymidylate est utilisée pour la synthèse de l'ADN et il a été montré que des faibles niveaux de folate peuvent conduire à une diminution des niveaux de thymidylate, entraînant donc une incorporation de l'uracile au cours de la synthèse de l'ADN en favorisant la fragmentation de l'ADN [Blount *et al.*, 1997].

La carence en folates peut entraîner une diminution de la synthèse de 5-méthyl-THF qui va être responsable d'une diminution de la disponibilité de SAM. La réduction de la quantité du SAM nécessaire pour les réactions de méthylation provoque une hypométhylation globale de l'ADN génomique, une méthylation aberrante, affectant ainsi l'expression des gènes [Bariol *et al.*, 2003 ; Frigola *et al.*, 2005]. Ceci pourrait favoriser le développement du cancer colorectal.

Plusieurs SNPs ont été répertoriés dans la MTHFR, les plus fréquents étant 677C > T et 1298A > C. Ils représentent respectivement chacun 15 et 12 % d'homozygotes dans la population caucasienne. C677T et A1298C s'accompagnent d'une réduction d'activité de la MTHFR qui est respectivement de 75 et 30 % et sont liés à une amélioration significative de la réponse au 5-FU [Cohen *et al.*, 2003 ; Etienne-Grimaldi *et al.*, 2007]. En clinique, quelques études sur de grands effectifs ont été réalisées. Néanmoins, ces différents travaux ont montré des réponses différentes au traitement selon le polymorphisme de MTHFR. Il a été indiqué précédemment que les deux polymorphismes de MTHFR 677C > T [Huang *et al.*, 2007 ; Hubner *et al.*, 2007] et MTHFR 1298A > C [Huang *et al.*, 2007] confèrent une protection contre le développement du cancer colorectal. Certaines études semblent montrer également que la mutation 677C > T est corrélée à une plus grande sensibilité au 5-FU [Cohen *et al.*, 2003] et à une meilleure réponse [Grimaldi *et al.*, 2010]. Toutefois, certaines études ont montré que le polymorphisme C677T de MTHFR n'est plus associé à la réponse dans le cas d'un schémas FOLFOX (5-FU associé à l'Oxaliplatine) [Marcellino *et al.*, 2006; Suh *et al.*,

## CHAPITRE 1

2006; Ruzzo *et al.*, 2007 ;Chua *et al.*, 2009]. Les données sur la survie sans progression et la survie globale sont encore plus fragmentaires. Étienne *et al.*, trouvent une survie écourtée en cas de mutation homozygote 1298A > C [Étienne *et al.*, 2004].

Les résultats existants dans la littérature, soutiennent donc la nécessité de continuer à étudier la valeur pronostique des deux principaux polymorphismes de gène de la MTHFR sur la réponse à un traitement à base du 5-FU de patients souffrant d'un cancer colorectal métastatique.

### **I.2.2. Irinotécan**

L'Irinotécan est un dérivé de la Camptothécine qui agit en inhibant les topoisomérases I. Il induit ainsi un arrêt de la réplication et de la transcription de l'ADN conduisant à la mort cellulaire.

#### **I.2.2.1. Présentation de la molécule**

##### **Généralités**

La Camptothécine (CPT) est un alcaloïde cytotoxique qui a été isolé de l'arbuste chinois *Camptopheca acuminata* et caractérisée pour la première fois en 1966 par Wall [Wall *et al.*, 1966]. Il s'est révélé actif sur les cancers animaux, mais très toxique pour l'homme et très difficile à utiliser. Il a donc été abandonné durant de longues années. Cependant, la Camptothécine est une molécule qui possède des propriétés cytotoxiques intéressantes, avec un mode d'action original : elle inhibe la re liaison des brins de l'ADN par la topoisomérase I. Initialement abandonnée à cause de sa faible solubilité en milieu aqueux et sa forte toxicité, le développement de cette molécule a été repris après la découverte de son mode d'action. De nombreux dérivés ont alors été synthétisés, visant une activité cytotoxique au moins égale, mais avec une toxicité moindre. Parmi de nombreux dérivés, deux d'entre eux, le topotécan et l'Irinotécan ont été montrés actifs dans le traitement des tumeurs, comme les cancers génitaux féminins, des bronches et du côlon.

L'Irinotécan ou CPT-11 (Campto®) a été synthétisé par Yokokura en 1981 [Yokokura *et al.*, 1981]. Ce dérivé d'alcaloïde est aujourd'hui utilisé dans le traitement du cancer de l'estomac, du rectum, de colon, de la vessie, du sida et de certains types de leucémies [Vanhoefer *et al.*, 2001].

##### **Structure et caractéristiques biochimiques**

## CHAPITRE 1

La Camptothécine et ses dérivés synthétiques sont constitués d'une structure pentacyclique contenant un groupement  $\alpha$ -hydroxy- $\delta$ -lactone dans le cycle E [Nabiev *et al.*, 1998] (Figure. I.8).

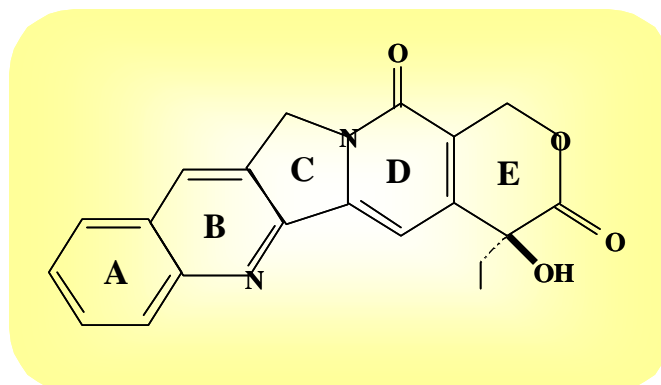


Fig. I.8. Structure de la Camptothécine

Il s'avère que le cycle E sous la forme lactone est critique pour l'activité antitumorale *in vivo* du CPT. Il est essentiel pour pénétrer à l'intérieur de la cellule et pour interagir avec la topoisomérase I [Hertzberg *et al.*, 1989].

L'ouverture du cycle, qui conditionne l'activité de la camptothécine et de ses dérivés est pH dépendant. Le cycle lactone (CPT active) s'hydrolyse rapidement et complètement en carboxylate (CPT inactive) dans les conditions physiologiques du sérum humain (pH 7.4, 37°C). Cette réaction d'hydrolyse est retardée dans le sang puisque le cycle lactone, très hydrophobe, s'enfouit dans la membrane cellulaire des globules rouges. La forme lactone est donc retrouvée lorsque la CPT est dans une solution à pH acide. (Figure I.9).

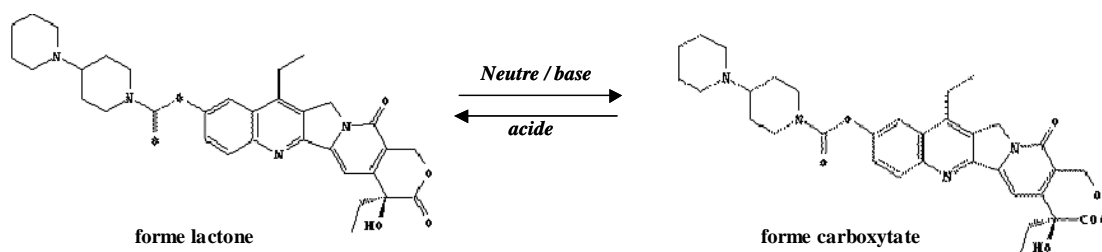


Fig. I.9. Introconversion réversible et pH-dépendante de l'Irinotécan

La forme carboxylate doit son caractère inactif au manque d'affinité entre son groupement carboxylate et la topoisomérase I.

### Pharmacocinétique

Après une perfusion d'Irinotécan chez l'homme, le taux plasmatique de cette molécule décroît de façon exponentielle. En revanche, les valeurs obtenues pour le SN-38 (le métabolite

## CHAPITRE 1

actif de l'Irinotécan) varie davantage principalement en fonction des individus, mais également du protocole, s'échelonnant entre 1 et 3h30 après la fin de perfusion de l'Irinotécan. La demi-vie de l'Irinotécan est de 6 heures chez les patients de 65 ans et de 5,5h chez les patients de moins de 65 ans. L'influence de l'insuffisance rénale ou hépatique sur le comportement pharmacocinétique de l'Irinotécan n'a pas été clairement étudiée. Chez les patients présentant une réduction de la fonction hépatique, l'administration de doses initiales d'Irinotécan plus faibles pourrait se révéler nécessaire [Camptosar, 2003].

Le CPT-11 et ses dérivés se lient aux protéines plasmatiques avec une prédominance pour l'albumine. Le pourcentage de liaison de l'Irinotécan est compris entre 30 et 68 % tandis que près de 98 % du SN-38 sont fixés à ces protéines [Chabot *et al.*, 1998].

Concernant l'élimination du CPT-11 il existe des nombreuses voies métaboliques dont certaines ne sont probablement pas encore identifiées. Parmi les mécanismes d'excrétion connus, le mécanisme majeur pour le SN-38 est la glucuronidation et le SN-38G est excrété majoritairement par la voie biliaire. Il est par la suite probablement hydrolysé dans l'intestin par les  $\beta$ -glucuronidases de la microflore intestinale. L'excrétion urinaire de l'Irinotécan (de 11 à 20 %), du SN-38 (< 1 %) et du SN-38 glucuronide (3 %) est faible.

L'APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin) est également retrouvé dans l'urine et la bile alors que le NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin) est peu présent dans les produits d'excrétion.

### **I.2.2.2. Irinotécan comme inhibiteur de la Topoisomérase I**

Les topoisomérases contrôlent la structure topologique de l'ADN en réalisant une « décompaction » sélective et réversible de l'ADN super-enroulé indispensable aux différentes fonctions de transcription, réplication, recombinaison ou réparation [Zhu *et al.*, 1996]. La topoisomérase I (Topo I) permet la relaxation de l'ADN super-enroulé en induisant une coupure transitoire de l'un des deux brins de l'ADN [Wang *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2002].

Plusieurs étapes sont nécessaires à la Topo I pour passer du stade d'ADN super-enroulé au stade de gène accessible à la transcription ou à la réplication :

a) La première étape est la fixation de la Topo I sur le double brin d'ADN, induisant une coupure simple-brin pour permettre à l'ADN d'être répliqué. C'est le domaine central de l'enzyme qui se liera à l'ADN, grâce à la reconnaissance d'au moins 20 paires de bases.

Cette réaction de clivage correspond à une trans-estérification réversible. Le site catalytique de l'enzyme (tyrosine en position 723) coupe le brin d'ADN au niveau d'une

## CHAPITRE 1

liaison phosphodiester. Une liaison covalente transitoire 3' phosphodiester se forme entre la tyrosine de la Topo I et le groupe 3' phosphate du simple brin d'ADN. La Topo I maintient alors les deux bras de l'ADN à l'abri des nucléases. Le complexe ainsi formé est appelé « complexe de clivage ».

b) L'étape suivante est représentée par une réaction de relaxation, avec le passage du brin d'ADN intact au travers de la brèche constituée à l'étape précédente. Donc, le brin coupé peut subir une rotation de 180° autour du brin fixe, réduisant ainsi les contraintes structurales de l'ADN par la libération d'un lieu topologique.

c) Lorsque l'ADN doit retrouver sa forme double brins fermée, la Topo I permet la religature des deux fragments de l'ADN (par une seconde trans-estérification où l'extrémité 5' libre hydroxyle du brin d'ADN coupé interagit avec la liaison 3' phosphodiester) et se sépare de l'ADN.

Pour ces trois étapes, l'énergie potentielle libérée par le desenroulement et la trans-estérification initiale suffit à permettre le déroulement des deux autres étapes avec un bilan énergétique nul.

### **Conséquences sur la réplication**

Dans les conditions normales, le complexe de clivage ADN-Topo I est une étape transitoire. L'action de l'Irinotécan est d'empêcher la reconstitution du double brin d'ADN après le clivage, inhibant ainsi la synthèse correcte de l'ADN. Pour cela, l'Irinotécan s'intercale entre le nucléotide +1 et -1 au niveau du complexe de clivage. Le complexe ADN-Topo I - Irinotécan, appelé complexe ternaire, est stabilisé par un ensemble de ponts hydrogènes entre l'Irinotécan et l'ADN d'une part et l'Irinotécan et la Topo I d'autre part. Ce complexe ternaire empêche la religation du brin d'ADN, générant une cassure simple brin de l'ADN [Pommier *et al.*, 2006].

Durant la phase S, lors de la réplication, la fourche de réplication nécessaire pour le doublement du matériel génétique, progresse le long du brin d'ADN. Lorsqu'elle rencontrera le complexe clivable, elle sera stoppée et entrera en collision avec le complexe, lorsque celui-ci est situé sur le brin sens de la synthèse d'ADN. Le site de coupure généré par la Topo I est alors présent sur le brin codant. L'ADN polymérase synthétise et prolonge le brin néoformé à partir du brin codant jusqu'à rencontrer le site de clivage. La réplication de ce site génère l'apparition d'une cassure double brin. La réplication est alors irréversiblement stoppée, entraînant la mort cellulaire [Pommier *et al.*, 2006] (Figure I.10).



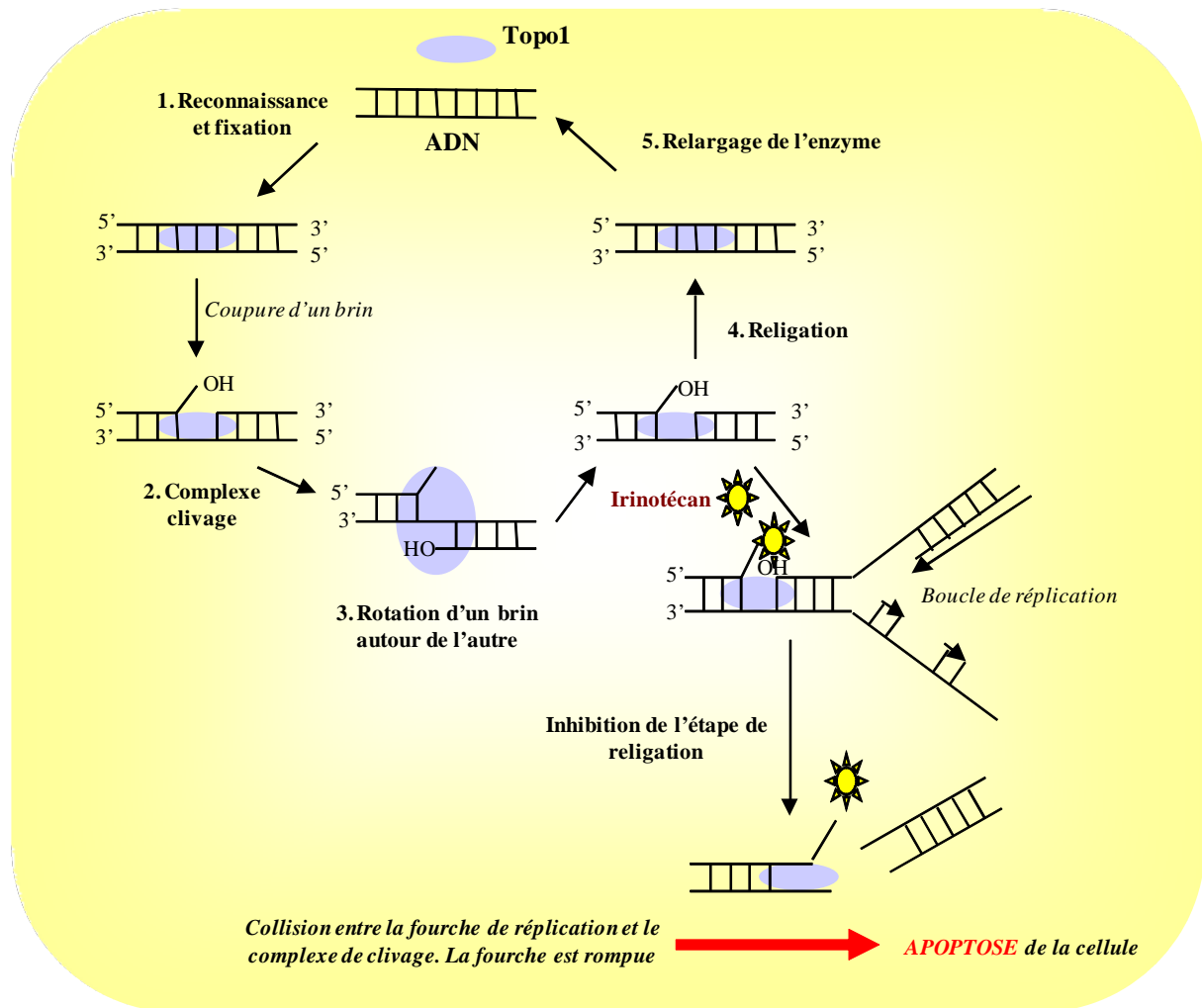


Fig. I.10. Mécanisme d'action de la topoisomérase 1 en l'absence d'inhibiteur (étapes 1 à 5) ; Mécanisme d'inhibition de la Topo1 par l'Irinotécan schématisé par un soleil [d'après Rivory *et al.*, 1995]

La topoisomérase I est ainsi une cible privilégiée des traitements anti-tumoraux.

### I.2.2.3. Métabolisme de l'Irinotécan

L'Irinotécan a un profil pharmacologique extrêmement complexe, du fait du grand nombre d'enzymes impliquées dans son métabolisme et son élimination. Différentes études ont montré que la majeure partie des réactions enzymatiques se déroulait dans le foie. Après administration, le CPT-11 suit trois grandes voies métaboliques, l'une catabolique, une autre anabolique et une voie de détoxification du SN-38. L'activité de l'Irinotécan résulte des importances respectives de ces voies. Le métabolisme de l'Irinotécan est schématisé dans la figure I.11 :

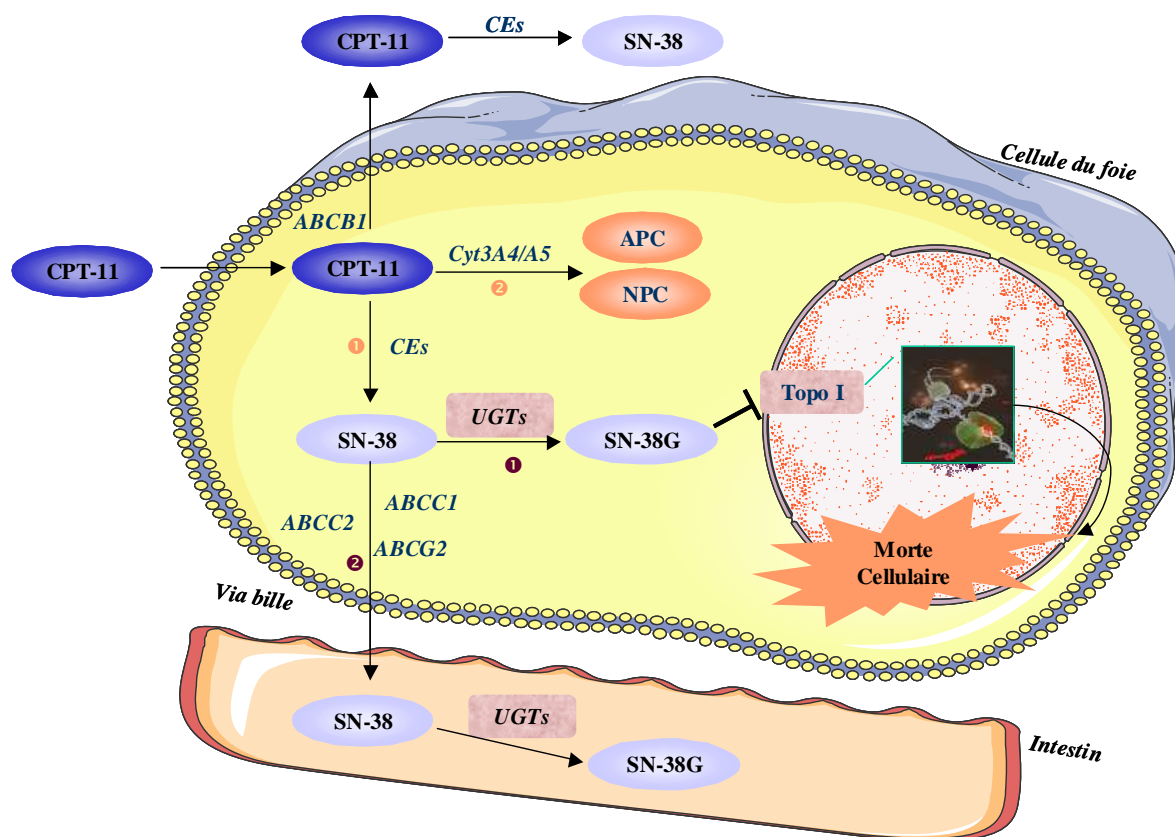


Fig. I.11. Métabolisme de l'Irinotécan

### Voie anabolique

L'Irinotécan est un promédicament activé majoritairement (suite une réaction d'hydrolyse enzymatique) par les carboxylestérases 1 et 2 (CE1 et CE2) [Hsiang *et al.*, 1985]. Ces enzymes clivent la chaîne latérale dipiperino du CPT-11 pour former le SN-38 (7-éthyl-10-hydroxyl-camptothécine) (Figure I.12). Le SN-38 possède une activité antitumorale environ mille fois supérieure au substrat initial et il est considéré responsable de l'activité biologique [Kawato *et al.*, 1991]. Différentes études ont démontré que CE2 était majoritairement impliquée dans la hydrolyse de l'Irinotécan [Xu *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2002]. Cette biotransformation est possible dans tout l'organisme, mais elle a lieu principalement dans le foie et dans le tractus digestif où cette enzyme est surexprimée.

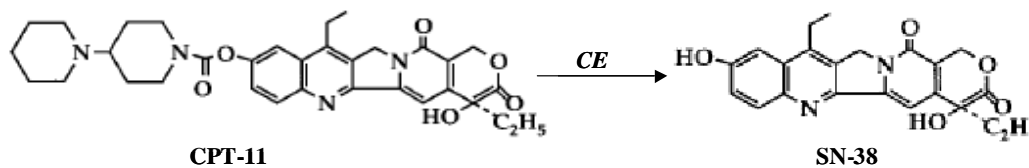


Fig. I.12. Transformation du CPT-11 en SN-38

### Voie catabolique

L'inactivation de l'Irinotécan se fait par la voie de détoxification des xénobiotiques. Au niveau hépatique, l'Irinotécan est soumis à une inactivation par l'intermédiaire des Cytochromes P450 (3A4 et 3A5). Ces enzymes catalysent la formation des produits peu actifs comme APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acide)-1-piperidino] carbonyloxycamptothécine) et NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothécine) ayant une activité cytotoxique modérée *in vitro* [Santos *et al.*, 2000]. L'APC est le plus abondant de ces métabolites. Il en résulte de l'hydroxylation de l'anneau pipéridine terminal de l'Irinotécan qui n'a aucune activité cytotoxique, mais représente la voie la plus importante d'élimination du CPT-11. Le NPC est présent en quantité moindre et résulte du clivage de l'anneau pipéridine distal (Figure I.13).

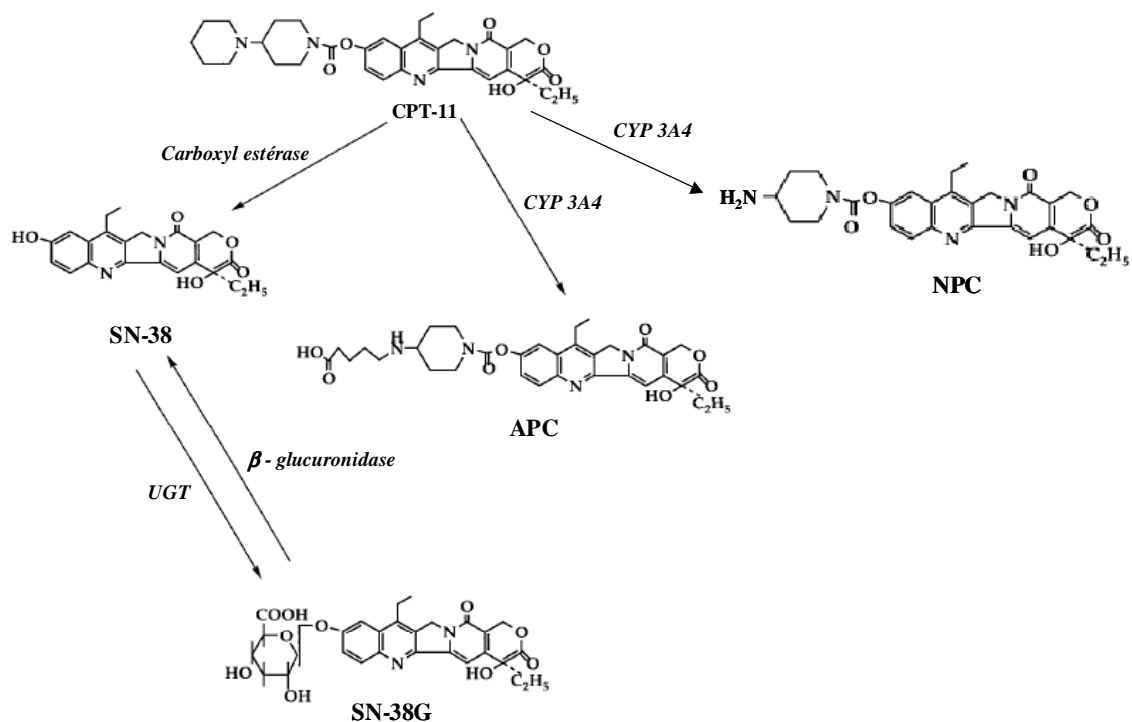


Fig. I.13. Hydrolyse du CPT-11 par les CYP3A [d'après Mathijssen *et al.*, 2003]

### Voie du détoxification du SN-38

L'élimination du SN-38 se fait par glucuronidation au niveau hépatique, en faisant intervenir essentiellement l'uridine diphosphate glucosyltransférase 1A1 (UGT1A1), mais probablement aussi par l'intermédiaire de l'UGT1A7 et UGT1A9 [Gagné *et al.*, 2002]. L'UGT1A6 est également impliqué dans la glucuronidation du SN-38 à des niveaux moins importants. Cette conjugaison rend la molécule hydrophile, facilitant son excrétion dans la bile.

## CHAPITRE 1

La réaction de glucuronidation peut être réversible. Cette réaction se déroule majoritairement dans les hépatocytes, puis le SN-38G est excrété par des transporteurs dans le canal biliaire pour rejoindre, via la bile, la lumière intestinale. La présence de  $\beta$ -glucuronidases provenant de la flore intestinale permet la déconjugaison du SN-38G en SN-38. Celui-ci peut être réabsorbé dans les cellules intestinales par diffusion passive pour rejoindre ensuite la circulation sanguine générale.

### **Transport de l'Irinotécan et de ses métabolites**

Parallèlement à son inactivation, l'Irinotécan et ses métabolites sont éliminés en faisant intervenir des différents transporteurs de la superfamille des ABC (ATP Binding Cassette). Ces protéines transmembranaires facilitent l'efflux d'un grand nombre de composés hors de la cellule et sont exprimés dans de nombreux tissus. Elles influencent la concentration intracellulaire de médicaments disponibles en permettant leur excrétion biliaire ou rénale.

Les trois grandes voies, activation, catabolisme direct du CPT-11 et détoxification du SN-38, ainsi que le transport cellulaire de cette molécule sont soumises à une variabilité, génétique ou environnementale, qui peut interférer avec l'activité et la tolérance de l'Irinotécan chez les patients.

Même si la pharmacologie de l'Irinotécan est très complexe et l'importance clinique de son métabolisme a été bien établie, il a été montré qu'une réduction de la glucuronidation du métabolite actif SN-38 est associée à l'augmentation de toxicités sévères: diarrhée et neutropénie [Gupta *et al.*, 1994 ; Iyer *et al.*, 2002], pouvant être la cause de l'arrêt du traitement.

#### **I.2.2.4. Facteurs pharmacogénétiques associés aux toxicités de l'Irinotécan : enzymes de métabolisme et enzymes cible**

L'Irinotécan est devenu un médicament majeur dans le traitement des tumeurs digestives et des tumeurs bronchiques. Mais de nombreuses toxicités, parfois graves, voire mortelles, ont été recensées dans les populations de patients traités. Ces toxicités sont évaluées selon les grades de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les toxicités dose-limitantes sont hématologique (neutropénies souvent fébriles) et digestive (diarrhées). Les diarrhées sont potentiellement graves, habituellement retardées, parfois accompagnées de fièvre. Elles peuvent engager le pronostic vital. En monothérapie, l'Irinotécan est à l'origine de 23 % à 30 % de diarrhées de grade 3-4, de 35 % à 50 % de neutropénies de grade 3-4, et de

10 % de neutropénies fébriles, en fonction du schéma utilisé. Les essais d'intensification thérapeutique menés ont déterminé une dose de 500 mg/m<sup>2</sup> toutes les trois semaines en monothérapie et de 260 mg/m<sup>2</sup> tous les quinze jours selon un schéma FOLFIRI (Irinotécan associé au 5-FU) [Gamelin *et al.*, 2004].

Il est connu que des variations génétiques peuvent jouer un rôle important dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du médicament. Ces variantes génétiques sont particulièrement importantes quand le métabolisme du médicament est réalisé par une voie principale spécifique. C'est le cas de l'Irinotécan. La détoxification du SN-38 est réalisé principalement par les enzymes de la famille des glucuronosyl-transférases (UGTs).

Dans le domaine de la pharmacogénétique, les efforts se sont focalisés ces dernières années sur les polymorphismes de l'UGT1A1 dans la population générale, et les retentissements éventuels qui peuvent en découler en terme de gestion des toxicités ou d'optimisation thérapeutique avec intensification de doses selon la population étudiée. *C'est également l'objet d'un de nos travaux présentés ici* (Chapitre III, **Publication 1**).

### ***1.2.2.4.1. UDP-glucuronosyltransférases (UGTs)***

La biotransformation est parmi les processus les plus importants qui détermine le profile pharmacocinétique d'un médicament administré. Ce processus est soumis à l'action des différents facteurs (l'état physiologique de patient, le statut génétique du patient ou la co-administration des autres médicaments) qui peuvent influencer le bon déroulement de la biotransformation du médicament. Ces différents facteurs sont donc responsables soit de la survenue des toxicités sévères soit d'un sous dosage de la molécule thérapeutique. Concernant l'interaction entre médicaments, une attention particulière a été attribuée à la compréhension de fonctionnement des mécanismes moléculaires responsables de la biotransformation. Ainsi, il a été constaté qu'au niveau du foie les médicaments peuvent subir deux types de réactions chimiques, de manière indépendante ou successive : il s'agit des réactions de phase I et les réactions de phase II.

Les réactions de phase I sont généralement des réactions de dégradation (d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse) ou de « fonctionnalisation ». Ces réactions sont soumises à l'action des enzymes appartenant notamment à la famille des cytochromes P450 [Dresser *et al.*, 2000].

Les réactions de phase II sont des réactions de synthèse ou de « conjugaison ». Le glucuronidation est la forme la plus répandue de « conjugaison » dans le métabolisme des

## CHAPITRE 1

mammifères. Cette réaction de glucuronoconjugaison est catalysée par la famille multigénique des UDP-glucosyltransférases (UGT).

### **Nomenclature des UGTs**

Les études ont mis en évidence l'existence, pour les UGTs, des 13 isoformes humaines et 7 isoformes pour le rat. Une nomenclature classant les UGT selon leur divergence évolutive a été proposée pour la première fois en 1991, et finalisée en 1997 [Mackenzie *et al.*, 1997].

La comparaison des séquences protéiques a conduit à la définition de deux familles (UGT1 et UGT2) et trois sous-familles au sein de la famille 2 (UGT2A, UGT2B et UGT2C). Les membres de la famille 1 sont de 35 à 50% identiques aux membres de la famille 2. La similarité entre les enzymes de la même sous-famille est supérieure à 60% et celle entre les sous-familles se situe entre 50% et 60% [Mackenzie *et al.*, 1997].

### **Fonction des UGTs**

Les UGTs catalysent le transfert d'un groupement glucuronide provenant du cofacteur, l'acide UDP-glucuronique, sur différentes molécules endogènes ou exogènes possédant un groupement hydroxyle, carboxyle, amine ou thiol. La molécule issue de cette conjugaison est généralement inactive, hydrosoluble, moins toxique et plus facilement excrétée dans la bile ou dans l'urine. Les composés endogènes et exogènes conjugués par les UGT incluent la bilirubine, les sels biliaires, les stéroïdes ainsi que divers médicaments. Dans des conditions physiologiques normales, la réaction de conjugaison relayée par les UGT est irréversible. De ce fait, cette famille d'isoenzymes aurait un rôle clé dans le catabolisme de différentes molécules.

### **Structure des UGTs**

Les protéines UGT sont localisées dans la partie luminale du réticulum endoplasmatique et également au niveau de l'enveloppe nucléaire.

Les UGT sont des enzymes membranaires de 528 à 531 acides aminés, qui peuvent être divisées en deux régions, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal [Hum *et al.*, 1999]. La partie amino-terminale est moins conservée d'une isoenzyme à l'autre, et cette portion variable semble conférer leur spécificité enzymatique aux UGT. Cette région de la protéine contient une séquence signal [Kinosaki *et al.*, 1993 ; Iyanagi *et al.*, 1986].

Chez les membres de la famille des UDP-glycosyltransférases a été identifiée une région consensus, située entre les résidus 350 et 400 qui est responsable de la liaison des

sucres [Mackenzie *et al.*, 1997]. L'analyse de la structure primaire de l'enzyme révèle un signal d'ancrage au réticulum endoplasmique composé de quatre acides aminés (KDEL-COOH = Lys-Asp-Glu-Leu-COOH) dans la région carboxy - terminale [Hum *et al.*, 1999] (Figure I.14), essentiel pour leur rétention dans la membrane du réticulum endoplasmique.

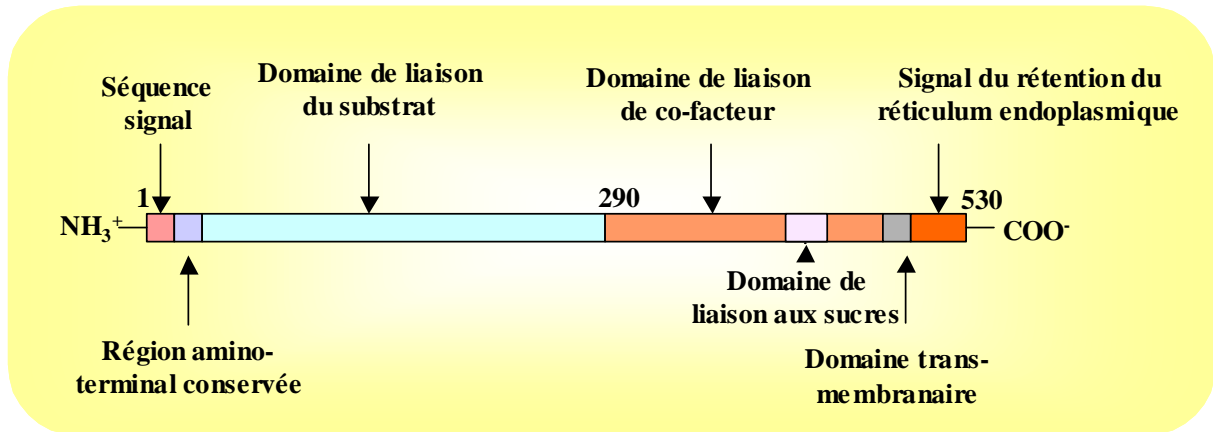


Fig. I.14. Représentation schématique de la structure des protéines des UGT1A

### Distribution tissulaire des UGTs

Le foie est l'organe prioritaire pour la glucuronidation en sachant qu'il est directement exposé à l'exposition des médicaments provenant de la veine porte. Des nombreuses études ont mis en évidence une expression principalement hépatique des certains membres de la famille des UGTs : UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 et UGT2B28 [Strassburg *et al.*, 1997 ; Fisher *et al.*, 2001]. Par contre, certains enzymes de la famille des UGTs sont exprimées principalement au niveau des tissus extrahépatiques. Par exemple, UGT1A7 est exprimé seulement au niveau de l'œsophage, de l'estomac et du poumon [Strassburg *et al.*, 1997], UGT1A8 et UGT1A10 au niveau du tractus gastro-intestinal [Cheng *et al.*, 1998] et UGT2A1 se trouve principalement au niveau de l'épithélium nasal [Jedlischky *et al.*, 1999].

La connaissance de la distribution des enzymes de la famille des UGTs ainsi que l'identification des concentrations des médicaments ou de leurs métabolites dans les différents tissus sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlés par ces enzymes.

### Régulation de l'expression des UGTs

Le taux d'expression de ces enzymes se trouve sous le contrôle des éléments promoteurs ou des séquences régulatrices qui encadrent les segments des régions codantes. Les modifications génétiques au niveau de ces séquences peuvent être responsables d'une

## CHAPITRE 1

altération de la quantité de protéine exprimée. Par exemple, il a été décrit que le polymorphisme au niveau de promoteur de l'UGT1A1 peut expliquer les variations au niveau de l'expression de l'enzyme [Guillemette *et al.*, 2003].

L'expression constitutive des enzymes UGTs dans les différents tissus dépend aussi des éléments régulateurs présents dans chaque tissu. Des études ont indiqué que l'expression hépatique de l'UGT1A, UGT1A6, ainsi que certaines enzymes de la sous-famille des UGT2B, sont sous le contrôle de l'Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) au niveau de la région promotrice de ces gènes [Mackenzie *et al.*, 2003]. Il a été montré que l'expression des enzymes des UGT est induite et se trouve sous le contrôle des facteurs de transcription qui à leur tour sont activés par des xénobiotiques, cancérogènes, signaux de stress et hormones. Parmi les facteurs de transcription connus pour jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des enzymes UGTs, on trouve le Pregnane X Receptor (PXR) et l'androstane receptor [Mackenzie *et al.*, 2003 ; Xie *et al.*, 2003]. Une étude de 2003 a mis en évidence le rôle de PXR dans la régulation de l'expression de l'UGT1A1 [Xie *et al.*, 2003].

### **Famille UGTs**

Chez l'homme, le gène de la famille UGT1 est localisé dans la région 2q37 [Mackenzie *et al.*, 1997]. Les membres de la famille 1 sont codés par un gène contenant 16 exons. Les données génomiques les plus récentes indiquent que le locus UGT1 possède au moins douze premiers exons différents, et que grâce à un mécanisme d'épissage alternatif, 12 transcrits sont issus de ce gène. Les exons 2 à 5 sont communs à l'ARNm de ces différentes UGT, alors que l'exon 1 est spécifique à chacune des formes. Les différents exons 1 codant pour la partie amino-terminale sont numérotés de 1 à 12 de 3' en 5'. Les exons 2, 11 et 12 correspondent à des pseudogènes contenant des mutations non-sens (codons stop) à l'intérieur de l'ADN complémentaire. Jusqu'à présent, huit protéines ont été caractérisées chez l'homme : UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 et UGT1A10. La fonction d'UGT1A5 n'est pas encore connue à ce jour (Figure 1.15).



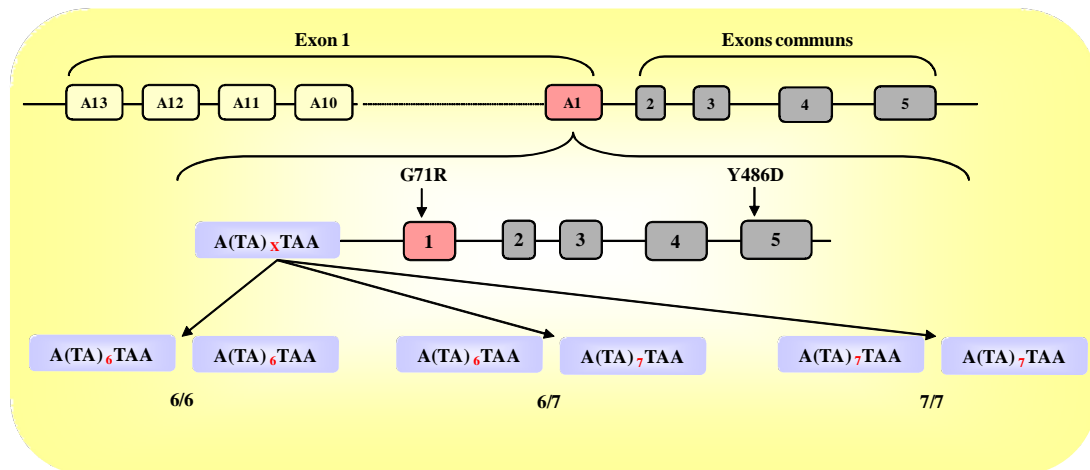


Fig. I.15. Structure de l'UGT1A1

### UDP-glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1)

UGT1A1 est une enzyme majeure de conjugaison qui est responsable de l'homéostasie de la bilirubine, ainsi que de la glucuronidation d'une grande majorité des xénobiotiques. Les déficits en glucuronidation responsables d'une hyperbilirubinémie libre ont conduit à l'analyse plus approfondie du gène *UGT1A1*. Des études ont mis en évidence qu'il existait aussi une variabilité inter-individuelle de l'activité UGT1A1, et donc de détoxication du SN-38.

Plusieurs recherches ont permis d'établir que l'incidence de survenue des toxicités sévères de l'Irinotécan était en grande partie liée à une mutation de l'UGT1A1 [Ando *et al.*, 2000 ; Carlini *et al.*, 2005 ; Innocenti *et al.*, 2004 ; Rouits *et al.*, 2004].

Dans les populations caucasiennes un polymorphisme dans la région promotrice de gène de l'UGT1A1 est à l'origine du syndrome de Gilbert. Il s'agit de l'insertion d'un couple TA au niveau de la région (TA)<sub>6</sub>TAA du promoteur du gène *UGT1A1\*1* résultant ainsi l'allèle variant (TA)<sub>7</sub>TAA *UGT1A1\*28* (Figure I.15). Ce polymorphisme est caractérisé par une diminution à 30% de niveau d'expression et d'activité de l'enzyme [Bosma *et al.*, 1995 ; Iyer *et al.*, 2002 ; Monaghan *et al.*, 1996]. Approximativement 7 % à 19 % de la population caucasienne présente la variante allélique *UGT1A1\*28*. Le syndrome de Gilbert est le plus souvent asymptomatique [Gamelin *et al.*, 2004], mais il peut s'aggraver sous l'impact des différents facteurs, comme le stress ou les infections [Bosma *et al.*, 2003]. À cause du polymorphisme de l'UGT1A1, les patients porteurs de ce syndrome présentent donc une diminution de la glucuronidation du SN-38, d'où un risque potentiel de toxicité. Dans les populations asiatiques, le syndrome de Gilbert est dû à des SNPs localisés sur des parties codantes : G71R et Y486D [Gamelin *et al.*, 2004]. L'allèle *UGT1A1\*28* à l'état homozygote

## CHAPITRE 1

prédomine dans le syndrome de Gilbert, mais d'autres mutations ont été rapportées, comme *UGT1A1\*6* ou *UGT1A1\*27* [Beutler *et al.*, 1998]. La variante *UGT1A1\*6* est associée avec le syndrome de Gilbert chez les patients asiatiques [Yamamoto *et al.*, 1998].

### UDP-glucuronosyltransférase 1A7 (UGT1A7)

UGT1A7 fait partie de la famille des protéines codées par le gène de l'UGT1A. Elle est située sur le chromosome 2q37. Il a été montré *in vitro* dans les cellules COS-1 que l'UGT1A7 glucuronide les substrats à un niveau 9 à 21 fois plus élevé respectivement à pH 6,4 et 7 comparé à l'UGT1A1. Il a été aussi mis en évidence que l'activité de l'UGT1A7 est 8,4 à 9 fois plus importante à pH 6,4 et 12 à 40 fois plus haute à pH 7,6 par rapport aux 7 autres isoformes [Ciotti *et al.*, 1999]. Un déficit en UGT1A7 pourrait diminuer l'élimination de nombreuses molécules cytotoxiques et avoir d'importantes conséquences. D'après une étude de Gupta, le taux individuel de glucuronidation est un facteur déterminant de l'activité, mais aussi de la toxicité attribuée au CPT-11 [Gupta *et al.*, 1994]. Jusqu'à présent, l'UGT1A1 était l'enzyme la plus étudiée, mais vu l'importance de l'UGT1A7 dans la glucuronidation, son intérêt est devenu croissant.

Des polymorphismes sont observés dans les régions variables du gène, incluant les séquences régulatrices et codantes, mais également les introns et les régions 5' et 3' non transcrites. Les conséquences phénotypiques peuvent être inexistantes ou bien peuvent modifier la capacité de glucuronidation chez un individu portant une mutation. Une glucuronidation réduite peut alors provoquer une accumulation d'un agent toxique au niveau intestinal [Guillemette *et al.*, 2000].

Diverses mutations du gène de l'UGT1A7 ont été associées à l'apparition de diarrhées, car l'UGT1A7 se trouve principalement dans les tissus intestinaux [Carlini *et al.*, 2005]. Une étude japonaise a montré que les génotypes de l'UGT1A7 n'étaient pas utilisables comme facteur de prédiction des toxicités sévères de l'Irinotécan puisque aucune relation entre mutations de l'UGT1A7 et toxicités n'a été trouvée [Ando *et al.*, 2002]. Cependant, il est bien connu qu'il existe des différences ethniques. Il serait donc intéressant de voir si une relation entre toxicités et polymorphisme de l'UGT1A7 existe chez les Caucasiens. *Cette hypothèse a été testée dans l'un des articles présentés dans le troisième chapitre de cette thèse (Publication 2).*

Nous avons choisi quatre SNP (Single Nucleotid Polymorphism) sur l'exon 1 du gène de l'UGT1A7, décrits dans la littérature et connus pour être liés à l'activité enzymatique *in vitro* : 387T>G, 391C>A et 392G>A, 622T>C. Ils correspondent respectivement aux

## CHAPITRE 1

substitution des acides aminés : G115S, N129K, R131K, E139D et W208R [Carlini *et al.*, 2005]. Ils sont tous situés dans le domaine de fixation au substrat de l'enzyme [Guillemette *et al.*, 2000]. Des études ayant montré que les mutations au niveau des acides aminés 129 et 131 sont liées, 4 groupes de génotypes sont possibles [Guillemette *et al.*, 2000] (Tableau I.3):

<i>Allèles</i>	<i>AA128</i>	<i>AA129</i>	<i>AA130</i>	<i>AA131</i>	<i>AA132</i>		<i>AA207</i>	<i>AA208</i>
<i>UGT1A7*1</i>	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	~	GTA	TGG
<i>UGT1A7*2</i>	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	~	GTA	TGG
<i>UGT1A7*3</i>	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	~	GTA	CGG
<i>UGT1A7*4</i>	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	~	GTA	CGG

Tab. I.3. Séquences d'*UGT1A7\*1*, *UGT1A7\*2*, *UGT1A7\*3* et *UGT1A7\*4* (AA : acide aminé)

Comme nous pouvons le remarquer, l'allèle *UGT1A7\*1* correspond aux génotypes sauvages N129, R131 et W208, l'allèle *UGT1A7\*2* regroupe les génotypes mutés K129 et K131 et le génotype sauvage W208. *UGT1A7\*3* rassemble les génotypes mutés K129, K131 et R208 et finalement, l'allèle *UGT1A7\*4* correspond aux génotypes sauvages N129 et R131 et le génotype muté R208.

Selon les combinaisons des SNPs, l'activité enzymatique en sera ou non affectée. Elle ne sera pas la même selon les variants présents sur les deux allèles d'un individu donné.

Des regroupements seront également réalisés (Tableau I.4) :

<b>Activité normale</b>	<b>Activité modérée</b>	<b>Activité basse</b>	<b>Activité indéfinie</b>
<i>UGT1A7*1/*1</i>	<i>UGT1A7*1/*2</i>	<i>UGT1A7*2/*2</i>	<i>UGT1A7*2/*3</i>
	<i>UGT1A7*1/*3</i>	<i>UGT1A7*3/*3</i>	<i>UGT1A7*1/*4</i>
			<i>UGT1A7*2/*4</i>
			<i>UGT1A7*3/*4</i>
			<i>UGT1A7*4/*4</i>

Tab. I.4. Activité enzymatique selon regroupement allélique

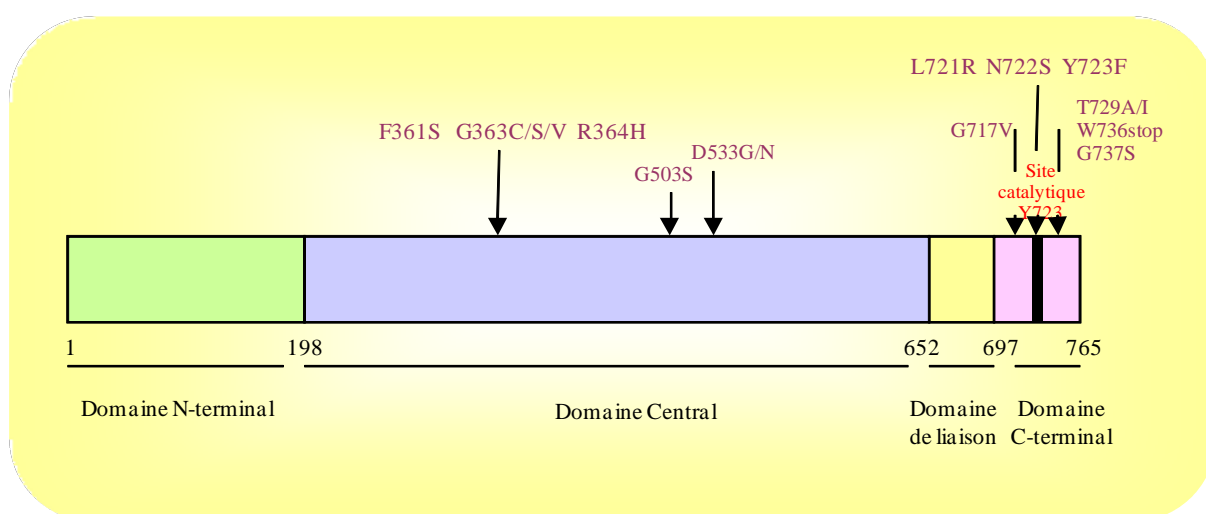
La mise en évidence de ces groupes de génotype chez la population de patients étudiés et leur liaison avec les phénomènes de toxicité permettrait d'alerter le clinicien avant le traitement.

### 1.2.2.4.2. *Topoisomérase I*

Actuellement, une vingtaine de mutations de la Topo I sont répertoriées sur l'ensemble du gène. Ces mutations sont retrouvées dans divers lignées cellulaires, chez la levure [Knab *et al.*, 1993] et plus récemment dans des tissus tumoraux pulmonaires prélevés chez des patients

## CHAPITRE 1

présentant des résistances au traitement [Rasheed *et al.*, 2003]. Ces mutations sont situées majoritairement sur des domaines fonctionnels importants, entraînant l'inhibition du clivage de l'ADN ou l'inhibition de la formation du complexe clivable Topo I-ADN-Irinotécan [Li *et al.*, 1996]. Des études réalisées *in vitro* ont mis en évidence que la plupart de ces mutations sont situées dans les zones clés du gène de la Topo I, (comme le domaine de fixation de l'ADN super-enroulé, au niveau de la zone entourant le site catalytique ou également dans la zone de fixation de l'Irinotécan) [Rasheed *et al.*, 2003 ; Chrencik *et al.*, 2004] (Figure I.16). Les mutations jouxtant cette région peuvent affecter sa fonctionnalité en limitant l'action de relaxation de l'ADN.



**Fig. I.16. Localisation de 16 mutations humaines sur la Topo1 [d'après Rasheed *et al.*, 2003]**

La majorité de ces mutations ont été trouvées dans des lignées cellulaires tumorales qui, au départ, étaient sensibles au CPT-11, puis sont devenues résistantes après de nombreuses expositions à des doses croissantes de CPT-11 [Andoh *et al.*, 1987 ; Chang *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 1997 ; Urasaki *et al.*, 2001]. Ces mutations ont donc été induites après exposition continue à la molécule.

Dans les différents tissus présentant une résistance acquise à l'Irinotécan, il a été montré que des mutations ponctuelles au niveau du gène de la Topo I sont responsables d'une diminution de son expression [Takatani *et al.*, 1997 ; Tsurutani *et al.*, 2002]. Cependant il n'y a pas actuellement de données suggérant l'implication des SNP de la Topo I dans la survenue des toxicités à l'Irinotécan.

### **1.2.2.5. Facteurs pharmacogénétiques associés aux toxicités et à la résistance à l'Irinotécan : protéines transporteurs**

Les résistances à l'Irinotécan se caractérisent soit par une absence de réponse au traitement, soit par un échappement progressif au cours des cures successives. Un patient est déclaré résistant lorsqu'il y a une progression de sa tumeur sous traitement. Elles peuvent être d'origine diverse :

- résistance de type pharmacocinétique et métabolique (modification de l'activité des enzymes impliquées dans l'activation et l'élimination du CPT-11)
- résistance de type cellulaire (modification de l'expression et de l'activité de la Topo I, cible du CPT-11 ou modification de la réparation de l'ADN)
- résistance de type membranaire (modification du transport du CPT-11 par les pompes ABC - ATP Binding Cassette - responsable d'efflux membranaires).
- résistance due à des modifications des récepteurs nucléaires ( comme par exemple SXR)

La survenue d'une résistance, demande une modification du protocole de chimiothérapie : soit en changeant les doses d'Irinotécan, soit en lui associant une autre molécule active dans les cancers colorectaux, soit en changeant le traitement.

Il est actuellement impossible de prédire d'emblée une résistance à l'Irinotécan.

Dans les paragraphes suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement à la résistance due à des modifications des transporteurs membranaires ou à des variations des récepteurs nucléaires.

#### **1.2.2.5.1. Transporteurs membranaires : généralités et structure**

Les transporteurs membranaires qui interviennent dans le phénomène de résistance cellulaire sont codés par les gènes de la famille ABC « ATP Binding Cassette ». Ces gènes représentent une importante famille de protéines transmembranaires qui fixent l'ATP et l'hydrolysent pour excréter un grand nombre de molécules toxiques hors des cellules. Il y a alors diminution de l'accumulation des toxiques actifs dans la cellule, et ainsi protection cellulaire. Du point de vue structural, ces protéines transmembranaires sont constituées de 2 domaines NBF « Nucleotide Binding Folds » de liaisons à l'ATP et de 2 domaines transmembranaires TMD « Transmembrane Domain ».

Les TMD sont formés de 6 à 11 régions en hélices-transmembranaires qui déterminent la spécificité au substrat et les NBF possèdent 3 domaines conservés, dont le plus important est un motif de signature C. Cette signature C est spécifique des transporteurs ABC et elle les distingue d'ailleurs des autres protéines liant l'ATP. La protéine peut se présenter sous forme

de dimère avec 2 NBF et 2 TMD ou sous forme de monomère avec 1 NBF et 1 TMD. Les gènes *ABC* sont classés en 7 familles de ABCA à ABCG, ce qui représente 48 gènes (Figure I.17).

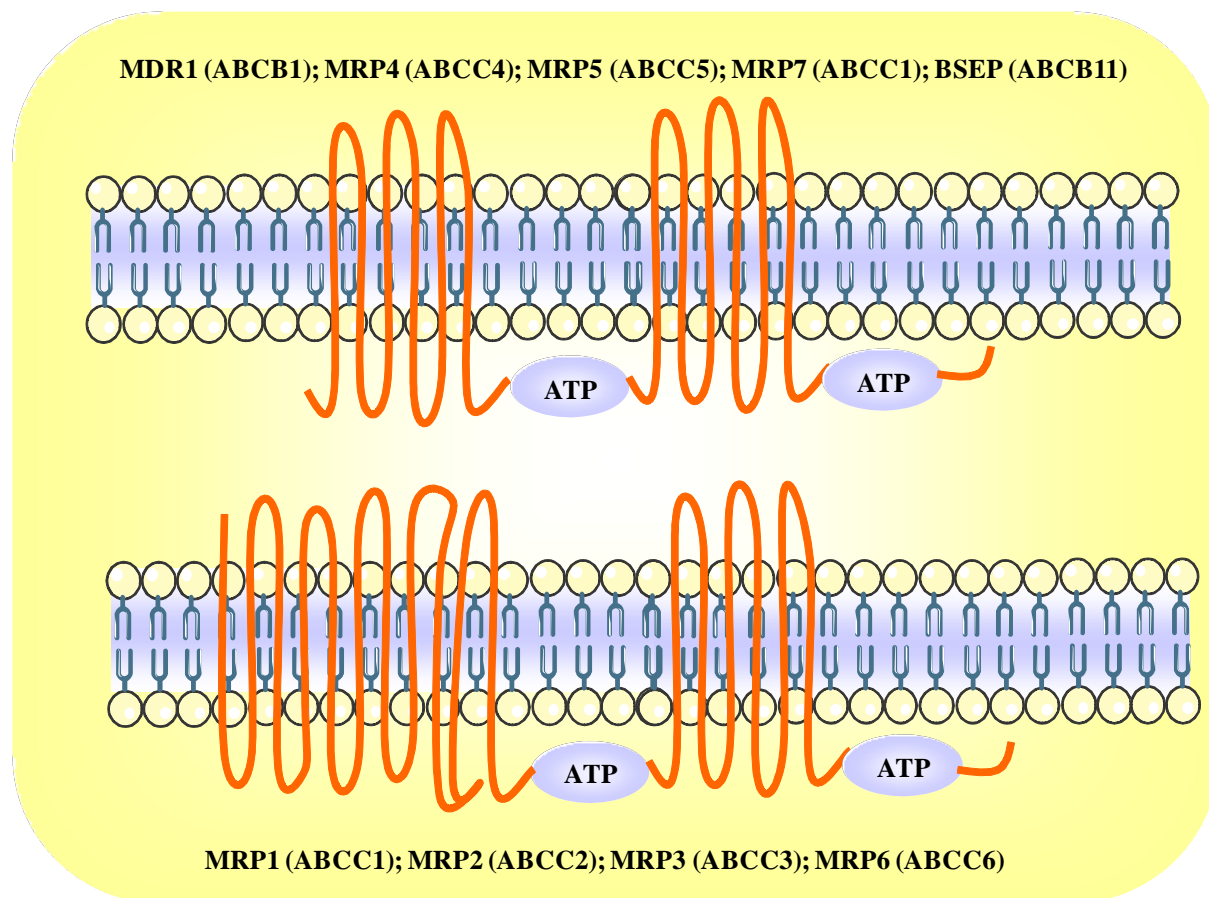


Fig. I.17. Structure de transporteurs ABC [d'après Gottesman *et al.*, 2002a]

### ABCG2 (breast cancer resistance protein)

Un membre de la famille des transporteurs ABC est ABCG2 [Allikmets *et al.*, 1998]. Le gène *ABCG2* (*MXR/BCRP/ABC-P*) est situé au niveau du chromosome 4q22 et code pour 16 exons, sur plus de 66 kb [Allikmets *et al.*, 1998 ; Mickley *et al.*, 2001]. L'analyse des lignés cellulaires résistantes au mitoxantrone a mené plusieurs laboratoires à identifier le gène *ABCG2* comme transporteur de cette molécule [Allikmets *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998]. Certaines études montrent que les cellules sensibles, transfectées par ABCG2 deviennent résistantes aux certains médicaments comme l'irinotécan et le topotécan [Ross *et al.*, 1999]. D'autres études ont mis en évidence qu'une surexpression de l'ABCG2 donne aux cellules cancéreuses une résistance aux différents médicaments comme topotécan et le SN-38 [Kobayashi *et al.*, 2005]. ABCG2 est exprimé entre autre dans les cellules cancéreuses, mais aussi dans le placenta, l'épithélium intestinal, le foie et les lobules du sein [Gottesman *et al.*, 2002b ; Rocchi *et al.*, 2000]. La localisation apicale d'ABCG2 au niveau de l'intestin et du

côlon indique son possible rôle dans la régulation de l'administration des différents médicaments. D'un point de vue structural, ABCG2 est un « demi-transporteur » qui contient 6 domaines transmembranaires (TMD), mais un seul domaine de liaison à l'ATP situé dans la partie N-terminale (Figure I.18).

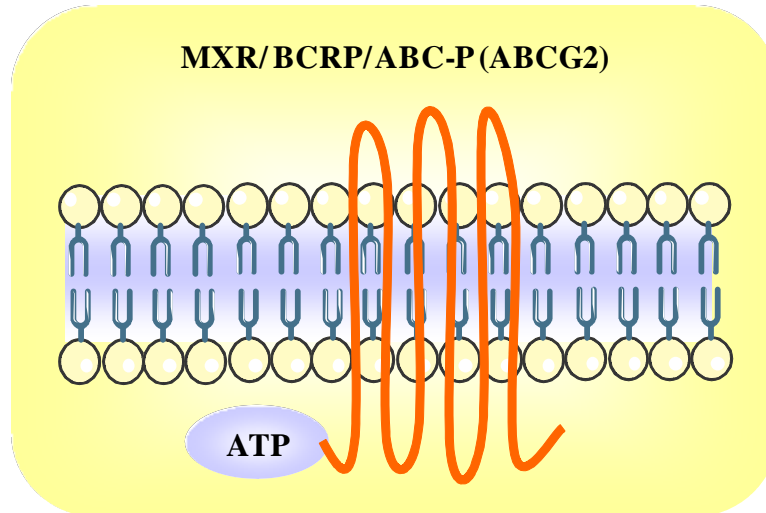


Fig. I.18. Structure de transporteur ABCG2 [d'après Gottesman *et al.*, 2002a]

Les études cliniques récentes indiquent que la grande variabilité interindividuelle dans la réponse d'un médicament est souvent la conséquence de changements au niveau moléculaire de diverses protéines, telles que les enzymes qui interviennent dans le métabolisme du médicament, des cibles du médicament et des récepteurs, et des transporteurs du médicament. La plupart des études sur des changements moléculaires se sont concentrées sur l'impact des SNPs sur l'expression et la fonction de ces protéines [Evans *et al.*, 2001]. Le séquençage de ce gène a révélé plus de 80 SNP existants, mais à ce jour, une quinzaine ont été retrouvées dans la population [Imai *et al.*, 2002]. Ces informations ont amené à s'intéresser plus particulièrement à 2 SNP : le C376T (substituant un codon stop Q126stop) et le C421A (Q141K). C421A (Q141K) est présente dans la plupart des populations [Imai *et al.*, 2002 ; Mizuarai *et al.*, 2004] : Caucasienne (10 %), Asiatique (31 %) et Africaine malgré une très faible fréquence dans la population Sud-saharienne (1%) [Mizuarai *et al.*, 2004].

Il a été montré que la résistance à l'Irinotécan semble être corrélée avec la présence du SNP C421A au niveau du gène *d'ABCG2* [Imai *et al.*, 2002]. Par contre, chez les patients avec un cancer du poumon à petites cellules, la survenue des toxicités importantes de grade 3 et 4 n'est pas liée à ce polymorphisme [Han *et al.*, 2007].

Le rôle pronostique d'ABCG2 dans la survie des patients avec un cancer colorectal reste une question à résoudre.

### I.2.2.5.2. Récepteurs nucléaires : généralités, structure

Les récepteurs nucléaires sont des récepteurs intracellulaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription activés par la liaison de leur ligand. Ils possèdent de ce fait deux domaines complémentaires : un domaine de liaison à l'ADN permettant la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques dénommées HRE (*Hormone Responsive Element*) et un domaine de liaison au ligand (Figure I.19). Les récepteurs activés se lient à l'ADN sous forme de dimères.

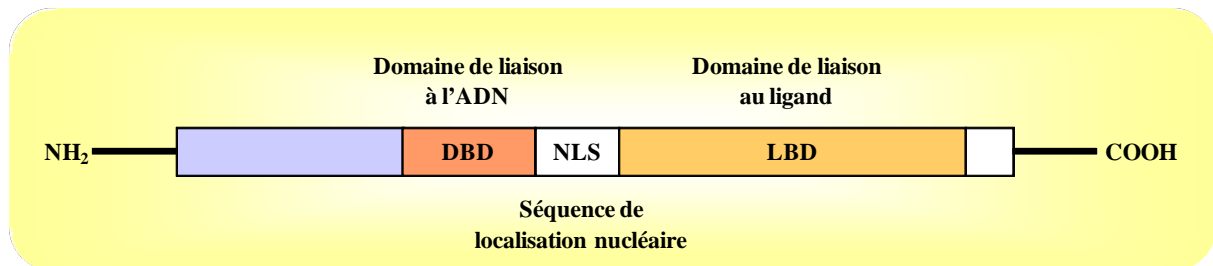


Fig. I.19. Structure générale des récepteurs nucléaires

Ces récepteurs peuvent être classés en 4 groupes en fonction de la dimérisation et des séquences d'ADN reconnues.

Les récepteurs nucléaires présentent la même structure générale, comprenant différents domaines fonctionnels notés de A à F. La région N-terminale (domaine A / B) est la plus variable en termes de taille et de séquence protéique. Il existe une forte homologie de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN « DNA Binding Domain » ou DBD et de liaison au ligand « Ligand Binding Domain » ou LBD. Les domaines AF1 en N-terminal et AF2 en C-terminal interviennent dans l'activation de la transcription (transactivation). Des séquences d'acides aminés permettant la dimérisation des récepteurs indispensables à l'activité transcriptionnelle, sont localisées dans les domaines C et E / F. La séquence NLS permet au récepteur de rester localisé dans le compartiment nucléaire.

Les récepteurs nucléaires agissent généralement comme senseurs pour les composants endogènes ou exogènes et transforment ces stimuli en réponses cellulaires en régulant l'expression de leurs gènes cibles.

Différents membres de cette famille ont été impliqués dans le contrôle de nombreux gènes de détoxification (phase I, II et III du métabolisme) des médicaments anticancéreux. Parmi eux, le récepteur aux stéroïdes et aux xénobiotiques (SXR) semble jouer un rôle clé dans ces mécanismes.



### **SXR (Steroid Xenobiotic Receptor)**

L'identification et la caractérisation de SXR (connu aussi sous le nom de PXR, hPAR ou NR1I2) en 1998 ont constitué un pas très important dans la compréhension des mécanismes de défense de l'organisme contre les substances toxiques, incluant les xénobiotiques [Bertilsson *et al.*, 1998 ; Blumerang *et al.*, 1998 ; Kliewer *et al.*, 1998].

Dès sa découverte, le récepteur PXR a été perçu également comme un régulateur transcriptionnel de l'expression des cytochromes P (CYP). Différentes études récentes ont montré que SXR est un facteur clé de transcription, responsable de l'activation de CYP3A4 et CYP3A7 [Bertilsson *et al.*, 1998 ; Blumerang *et al.*, 1998 ; Pascussi *et al.*, 2001 ; Xie *et al.*, 2000]. Ces résultats sont soutenus par la co-expression de SXR et de CYP3A dans les mêmes tissus (foie, côlon, intestin, moelle osseuse et cerveau) [Westlind-Johnsson *et al.*, 2003]. De plus, des études réalisées sur des souris PXR *-/-* ont mis en évidence une dérégulation de l'expression de CYP3A [Kliewer *et al.*, 2003].

En plus de son rôle dans la régulation de l'expression de CYP3, SXR intervient aussi dans la régulation de l'expression des autres enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments, comme l'UGT1A1 et la GST (Glutathion-S-Transferase) [Kliewer *et al.*, 2002 ; Kliewer *et al.*, 2003 ; Gardner *et al.*, 2004]. SXR est aussi lié à l'activation de la transcription des quelques transporteurs membranaires ABC, comme le MDR1 et le MDR2 [Kast *et al.*, 2002]. Il a aussi été montré dans le laboratoire une activation directe de SXR par le SN-38, conduisant à une modulation de l'expression de l'UGT1A1 [Basseville *et al.*, **article en soumission**].

Le gène de *SXR* (NR1I2) est situé sur le chromosome 3q13-21. Il compte environ 35kb et il est composé de 10 exons et 9 introns. Ce récepteur présente 3 isoformes majoritaires décrites chez l'homme, obtenus par épissage alternatif et dénommées différemment selon les équipes :

1. La première forme, connue sous le nom SXR.1, compte 4,4 kb et est référencée comme SXR, hPAR.1 ou hPXR.1 [Blumerang *et al.*, 1998 ; Bertilsson *et al.*, 1998 ; Lehmann *et al.*, 1998]. Certaines études ont montré que l'ARNm de cette isoforme est exprimé en grande quantité au niveau du foie et moins au niveau de l'intestin. Il a été montré récemment que cette isoforme est responsable de l'induction de l'activité de l'UGT1A1, en présence de rifampicine, dans les cellules HepG2 [Gardner-Stephen *et al.*, 2004].

2. La seconde forme (SXR.2), issue d'un épissage alternatif du l'exon 1, est la plus courte (2,8 kb), mais possède la séquence codante la plus longue avec une extension de 117

## CHAPITRE 1

nucléotides située sur son extrémité 5'. Elle est également dénommée hPAR2 par Bertilsson [Bertilsson *et al.*, 1998].

3. SXR.3, la troisième isoforme de SXR, compte 4,3 kb. Cette isoforme se caractérise par une délétion de 111 nucléotides (823-933) dans la première moitié de l'exon 5, du fait d'un épissage alternatif. Cette isoforme a été nommée hPXR.2 lors de sa découverte [Dotzlaw *et al.*, 1999].

Des études plus récentes indiquent l'existence de formes supplémentaires de SXR dans le foie [Fukuen *et al.*, 2002].

D'un point de vue structural, SXR (comme tous les récepteurs nucléaires) contient un DBD comprenant les acides aminés de 41 à 107 et un LBD entre les acides aminés 141 et 434. L'activation de SXR est réalisée par la liaison du ligand au niveau du domaine LBD. Le domaine de liaison à l'ADN permet la liaison du récepteur au niveau des régions promotrices de ces gènes cibles, nommées aussi les éléments de réponse aux xénobiotiques (XREs).

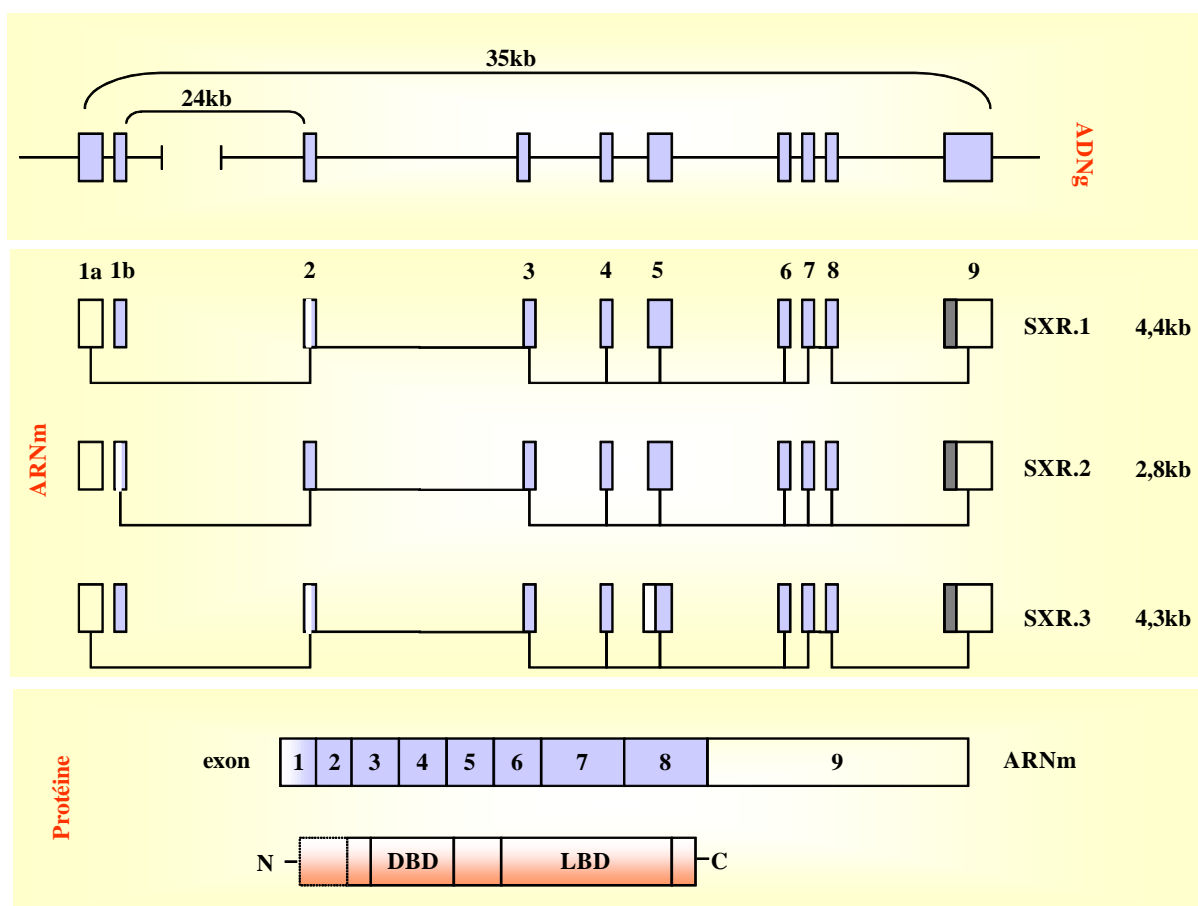


Fig. I.20. Structure de SXR

La région codante des différents isoformes correspond aux exons 2 à 9 (1 à 9 pour SXR.2). SXR1, SXR.2 et SXR.3 comptent respectivement 434 acides aminés, 473 acides

## CHAPITRE 1

aminés (insertion de 39 acides aminés en N-ter) et 397 (délétion de 37 acides aminés sur l'exon 5). SXR.1 et SXR.3 ont la particularité de posséder un codon CTG initiateur, tandis que SXR.2 débute en aval par un « classique » ATG [Bertilsson *et al.*, 1998].

Il est possible que les différents transcrits de SXR aient des capacités de fonctionnement différentes. Hustert et son équipe [Hustert *et al.*, 2001] ont par exemple montré que SXR.3 (auquel il manque 37 acides aminés dans le LBD) aurait une plus faible activité basale sur le promoteur d'un de ses gènes cibles.

Actuellement, les SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) dans le gène de SXR ont été décrites par les équipes de Zhang [Zhang *et al.*, 2001b] et Hustert [Hustert *et al.*, 2001] qui ont signalé la fréquence des allèles SNP chez les caucasiens et les africains. Koyano et ses collaborateurs ont fait de même chez une population japonaise [Koyano *et al.*, 2002].

Les premières études avaient identifié environ 40 SNP dans le gène de SXR, incluant sept mutations faux-sens qui conduisaient à des variants protéiques chez les caucasiens et les africains [Hustert *et al.*, 2001].

Plusieurs études ont décrit des polymorphismes dans le gène *PXR* et leur influence sur l'expression de *CYP3A4*. Hustert *et al.* ont exprimé trois variants de protéines (V140M, D163G et A370T) dans les cellules LS174. Ces protéines modifiées présentaient une altération du niveau basal d'expression des gènes cibles de SXR ou une modification de leur induction après stimulation à la rifampicine [Hustert *et al.*, 2001]. La fréquence allélique de chacune de ces mutations faux-sens est inférieure à 2 %. Koyano et ses collaborateurs ont également répertorié quatre mutations faux-sens (R98C, R148Q, R381W et I403V) chez une population japonaise [Koyano *et al.*, 2002]. Ces variants génétiques ont montré des degrés différents de réduction de l'induction, en fonction de la dose d'activateurs de *PXR*.

Les fréquences observées sont assez faibles pour l'ensemble de ces mutations faux-sens et, connaissant la forte variabilité de la réponse individuelle face aux xénobiotiques, il est peu probable que ces seules mutations puissent expliquer les nombreuses différences observées dans le métabolisme des drogues.

Parmi les polymorphismes de SXR, un grand nombre est retrouvé sur les séquences promotrices ou introniques du gène de SXR. Bien que moins étudiées, certaines de ces mutations ont un impact sur l'activité de SXR, sachant que la localisation de ces mutations ne permet pas systématiquement d'expliquer l'altération de l'activité de SXR.

Zhang et ses collaborateurs [Zhang *et al.*, 2001b] ont dépisté 32 polymorphismes dans des séquences non codantes du gène de SXR. Dix d'entre elles sont liées à des modifications dans l'expression de SXR ou d'un de ses gènes cibles, à des degrés plus ou moins importants.

## CHAPITRE 1

Ces mutations sont retrouvées à des fréquences alléliques atteignant parfois les 40 %. Au vu de ces fréquences élevées et de leur répercussion potentielle sur l'incidence de certaines maladies ou la survie des patients, leur importance ne peut être ignorée.

L'étude des SNPs les plus fréquentes de SXR pourrait donc offrir une image plus claire en ce qui concerne la régulation des gènes cibles de SXR, mais aussi sur la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique des médicaments métabolisés par ces gènes comme l'Irinotécan.

### **I.2.3. Oxaliplatine**

L'Oxaliplatine est un médicament anticancéreux de synthèse du groupe des agents dérivés de platine, utilisé dans le traitement de cancer colorectal en association avec 5-FU afin d'augmenter le taux de réponse à la chimiothérapie.

#### **I.2.3.1. Présentation de la molécule**

##### **Généralités**

L'Oxaliplatine ou l-OHP est un dérivé de troisième génération de sels de platine. Dans différents essais expérimentaux il a montré, pour la même dose ou pour des doses plus faibles, la même efficacité que le Cisplatine et la Carboplatine. Cette molécule est aussi efficace dans certains types des cancers comme le cancer du testicule, ovarien et le cancer du sein [Lebwohl *et al.*, 1998]. Par rapport à d'autres sels de platine, l'Oxaliplatine n'est pas néphrotoxique, cardiotoxique ou mutagène. Il est par ailleurs peu hématotoxique et neurotoxique. Combiné avec 5-FU, cette molécule a montré une importante amélioration de réponse au traitement dans le cancer colorectal.

##### **Structure et caractéristiques biochimiques**

Dans l'Oxaliplatine [l-OHP, oxalato (trans-1,2-diaminocyclohexane) platinum(II)], un groupement 1,2 diaminocyclohexane (DACH) substitue les deux radicaux aminés du Cisplatine [Chaney *et al.*, 1995 ; Raymond *et al.*, 1998] (Figure I.21).

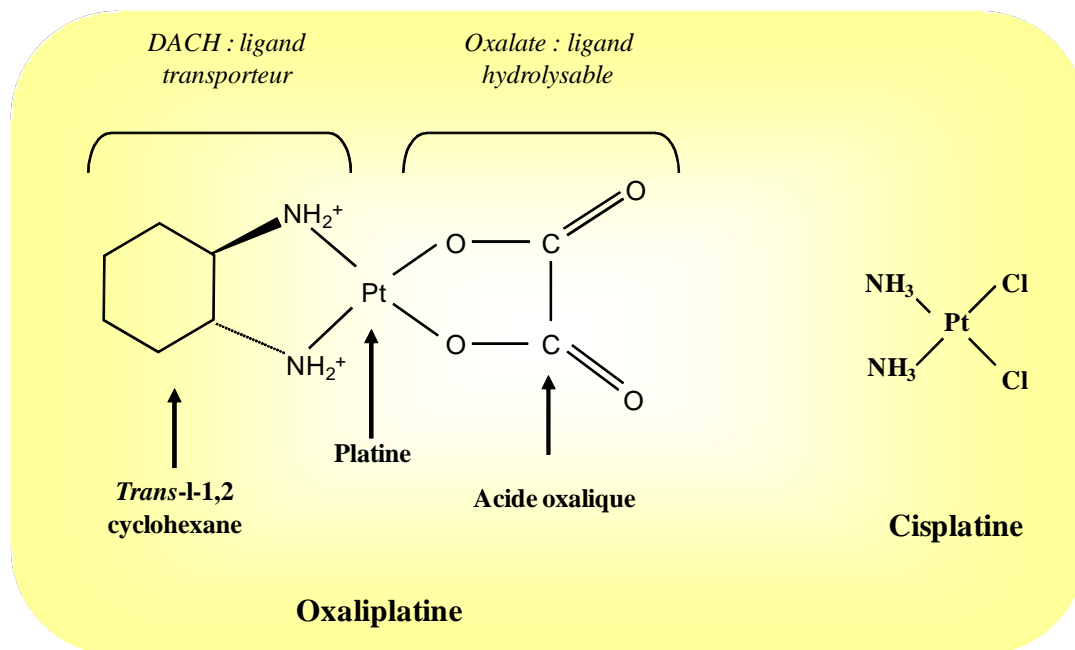


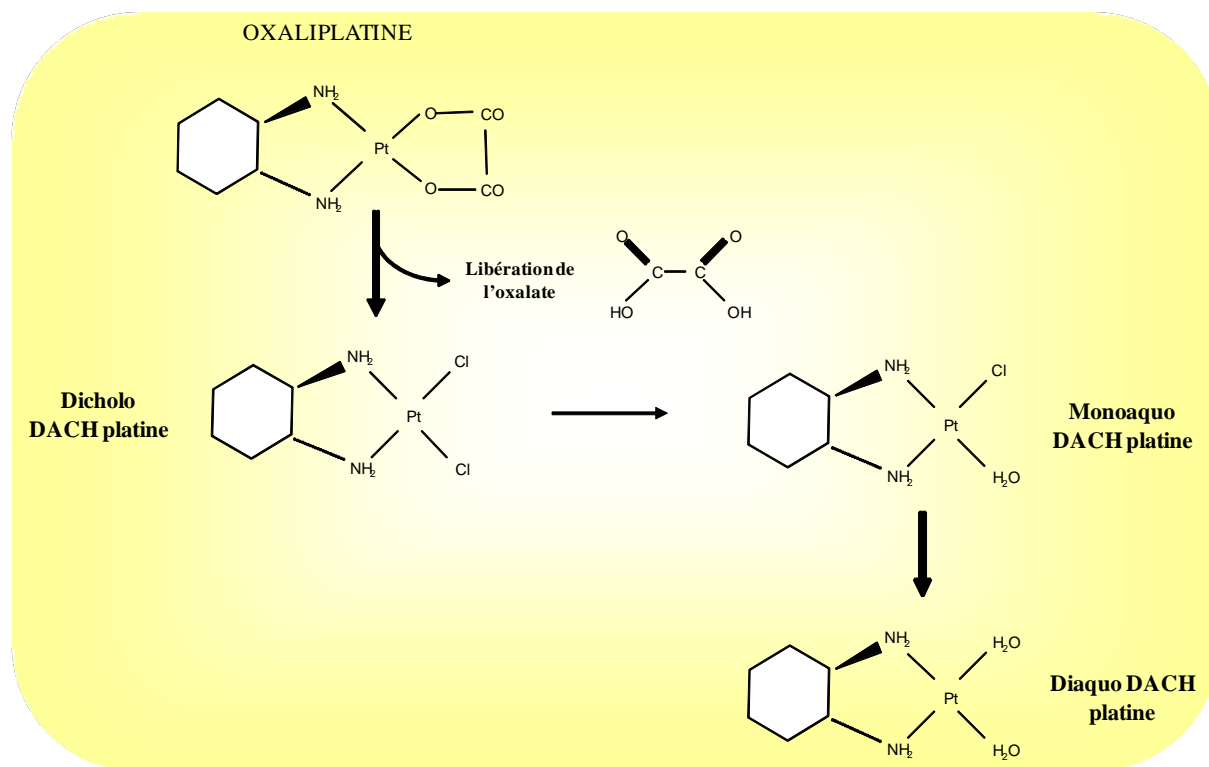
Fig. I.21. Formule détaillée de l'Oxaliplatine et de la Cisplatine

Grâce à sa structure, Oxaliplatine présente des propriétés caractéristiques qui le différencie en particulier des autres dérivés du platine, notamment Cisplatine et Carboplatine, tant sur le plan chimique et biologique, que sur le plan clinique. La substitution des deux radicaux aminés permet d'obtenir un composé de meilleure activité anti-tumorale avec une diminution ou même une perte de la résistance croisée avec Cisplatine, dans un large spectre des tumeurs *in vivo* et *in vitro* [Weiss *et al.*, 1993 ; Kelland *et al.*, 1994 ; Raymond *et al.*, 1998].

### Pharmacocinétique

L'Oxaliplatine est rapidement absorbé et transformé par voie non enzymatique en composé actif : le DACH-dichloro-platine (Figure I.22). Ce DACH-platine représente environ 70% de l'Oxaliplatine qui pénètre dans les cellules. Après 2 heures, on détecte dans le plasma plusieurs produits : DACH-dichloro-platine, DACH-chloro-hydroxy-platine, adduits de méthionine, de glutathion et de cystéine [Pendyala *et al.*, 1995 ; Graham *et al.*, 2000].

L'Oxaliplatine est donc un promédicament activé par hydrolyse non-enzymatique en composés réactifs capables d'interagir avec l'ADN, mais aussi de se fixer aux protéines et d'interférer avec la synthèse de l'ARN [Graham *et al.*, 2000 ; Kweekel *et al.*, 2005 ; Pendyala *et al.*, 1995] (Figure I.22).



**Fig. I.22. Biotransformation de l'Oxaliplatine**

Des études cliniques européennes de phase II ont apporté des résultats encourageants en termes d'activité, mais aussi de la gestion de la toxicité de l'Oxaliplatine dans certaines tumeurs résistantes au Cisplatine [Cvitkovic *et al.*, 1998]. Cette molécule a montré une activité cytotoxique dans les tumeurs du colon, du poumon et aussi dans le lymphome non-Hodgkinien [Mathé *et al.*, 1991 ; Misset *et al.*, 1991]. Tous ces résultats cliniques, en cohérence avec les résultats obtenus *in vitro*, suggèrent que l'Oxaliplatine possède un large spectre d'action manifestant une activité importante dans les tumeurs résistantes au Cisplatine [Pendyala *et al.*, 1993 ; Kraker *et al.*, 1988].

### Toxicités

L'utilisation de l'Oxaliplatine dans le traitement du cancer colorectal métastatique a prouvé son efficacité en première et deuxième ligne métastatique, notamment en association avec le 5-FU et l'acide folinique [de Gramont *et al.*, 2000 ; Goldberg *et al.*, 2004]. Il est aussi proposé en adjuvant avec une efficacité supérieure au traitement par 5-FU seul [André *et al.*, 2004]. Sa principale toxicité est hématologique avec des toxicités de grade 3 ou 4 retrouvées dans environ 40 % des cas. La toxicité digestive est faible. La toxicité neurologique, si elle n'est jamais vitale, est susceptible de diminuer profondément la qualité de vie lorsqu'elle est importante et persistante. Cette neurotoxicité survient chez 30 % des patients. Elle est

sensitive, cumulative et régressive à l'arrêt du traitement dans la majorité des cas. Dans le laboratoire il a été démontré un effet bénéfique d'une co-administration de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  pour limiter les effets neurotoxiques de l'Oxaliplatine [Gamelin *et al.*, 2007]. Cette pratique est maintenant appliquée. Cependant, 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. Ainsi, 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 [Gamelin *et al.*, 2007]. 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 AminoTransférase (AGXT). Cette hypothèse a été explorée au cours d'une publication présentée dans ce travail de thèse (**Publication 3**).

Par ailleurs, comme tous agents de type « métaux lourds », l'Oxaliplatine est éliminé par des systèmes enzymatiques impliquant particulièrement la Glutathione S-Transférase  $\pi$  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 [Ruzzo *et al.*, 2007 ; Lecomte *et al.*, 2006]. L'exploration de cette voie de recherche visant à cibler des polymorphismes à risque de la GSTP1 fait également l'objet d'une des publications présentées dans le chapitre III (**Publication 3**).

En conclusion, le choix de ce médicament doit être effectué au vu du bénéfice attendu, et l'existence d'un facteur prédictif de chimiosensibilité apparaît très important pour ne pas exposer inutilement à des toxicités parfois importantes des personnes peu susceptibles de répondre à un traitement par Oxaliplatine.

### **1.2.3.2. Mécanisme d'action de l'Oxaliplatine**

Le mécanisme d'action des dérivés de platine n'est pas clairement établi. L'Oxaliplatine est un agent alkylant dont l'action cytotoxique sur l'ADN se manifeste par la formation de mono-adduits de platine entre deux guanines adjacentes, ou plus rarement, entre une guanine et une adénine, secondairement convertis en di-adduits [Faivre *et al.*, 2003 ; Woynarowski *et al.*, 1998 ; Woynarowski *et al.*, 2000 ; Reardon *et al.*, 1999]. S'ils ne sont pas éliminés, les

## CHAPITRE 1

adduits d'Oxaliplatine sont létaux pour la cellule [Sanderson *et al.*, 1996]. L'Oxaliplatine a une cytotoxicité renforcée car elle crée une distorsion dans la structure de l'ADN, supérieure à celle des adduits formés avec les autres sels de platine, bloquant ainsi plus efficacement la réplication et la transcription [Scheeff *et al.*, 1999]. En effet, alors que l'Oxaliplatine semble entraîner le même type de lésions que le Cisplatine au niveau des mêmes sites moléculaires, sa cytotoxicité apparaît plus importante [Rixe *et al.*, 1996]. Différentes études ont montré qu'en concentration équimolaire, l'Oxaliplatine forme 2 à 10 fois moins d'adduits que le Cisplatine ou le Carboplatine [Faivre *et al.*, 2003 ; Woynarowski *et al.*, 1998 ; Woynarowski *et al.*, 2000 ; Hector *et al.*, 2001]. Cette observation présume de la présence d'autres types de lésions cellulaires impliquées dans la cytotoxicité.

L'Oxaliplatine peut être efficace sur des cancers résistants au Cisplatine. Cela suggère l'existence des mécanismes d'action différents.

Les ponts intra-brins, ainsi que des ponts inter-brins (dans une plus faible proportion) créés par l'Oxaliplatine, sont à l'origine de l'inhibition de la synthèse de l'ADN et interfèrent avec les mécanismes de réparation conduisant à l'apoptose cellulaire [Scheeff *et al.*, 1999]. Certains systèmes de réparation intervenant dans la réparation des dommages créés par le Cisplatine ou le Carboplatine, notamment MMR et NER, sont moins efficaces dans la réparation des lésions liées à l'Oxaliplatine [Raymond *et al.*, 2002]. Ainsi, une étude de 2002 s'intéressant à l'effet cytotoxique des sels de platine sur les cellules déficientes en MMR, a mis en évidence que ces cellules résistent à l'action du Cisplatine, mais restent sensibles à celle de l'Oxaliplatine [Raymond *et al.*, 2002].

L'Oxaliplatine a présenté, contrairement au Cisplatine et au Carboplatine, une activité *in vivo* et *in vitro* sur le cancer colorectal [Raymond *et al.*, 1998a]. La démonstration de cette activité dans le traitement des cancers colorectaux est un argument en faveur de l'originalité pharmacologique de cette molécule.

Les études *in vitro* et *in vivo*, chez la souris ou le rat, ont dévoilé un effet additif ou synergique sur différentes lignées cellulaires à l'occasion de l'association de la molécule avec différents autres cytotoxiques dont le 5-FU, l'Irinotécan, la gemcitabine, le cyclophosphamide et les taxanes [Jacobson *et al.*, 2002]. Le mécanisme de la synergie d'action avec le 5-FU, confirmé en clinique, n'est pas parfaitement élucidé. Une dérégulation de la thymidylate synthase et une réduction du catabolisme du 5-FU en métabolites inactifs par l'action de la DPD pourraient expliquer, à côté de l'action propre de la molécule, la synergie d'action de l'association Oxaliplatine/5-FU sur des tumeurs résistantes au 5-FU [Fischel *et al.*, 2002].



### I.2.3.3. Mécanismes impliqués dans la résistance à l'Oxaliplatine

Malheureusement, l'apparition des résistances au traitement limite l'efficacité de ces molécules dans la plupart des maladies. La résistance à une thérapie à base de sels de platine peut être intrinsèque ou acquise et peut être soumise au contrôle des facteurs externes ou internes. Elle est par conséquent un processus multifactoriel [Perez *et al.*, 1998 ; Stewart *et al.*, 2007 ; Agarwal *et al.*, 2003]. Dans la littérature, plusieurs mécanismes responsables d'une diminution de la sensibilité à l'Oxaliplatine sont décrits. Il s'agit soit d'une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament, soit d'une augmentation de la détoxification intracellulaire de la molécule et d'une augmentation de la réparation des adduits créés au niveau de l'ADN (Figure I.23).

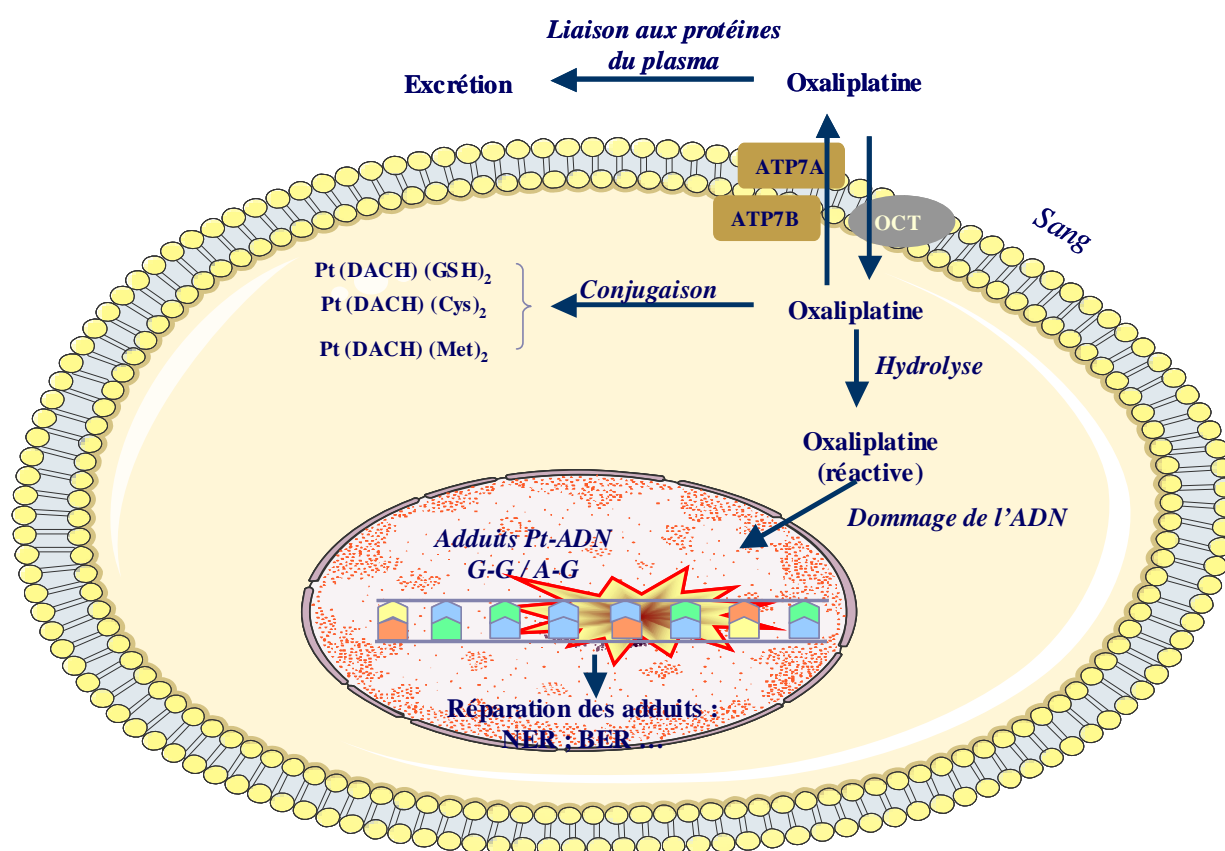


Fig. I.23. Mécanismes impliqués dans la résistance à l'Oxaliplatine.

#### Détoxification cellulaire

Les processus responsables du transport des sels du platine à l'intérieur de la cellule ne sont pas complètement compris. Toutefois il est bien clair qu'une diminution de l'accumulation de la molécule semble le mécanisme le plus commun dans l'apparition de la résistance au traitement. Le processus de conjugaison avec le glutathion est catalysé par les enzymes glutathion-S-transférases (GSTs) et il sera responsable d'une inactivation de la

## CHAPITRE 1

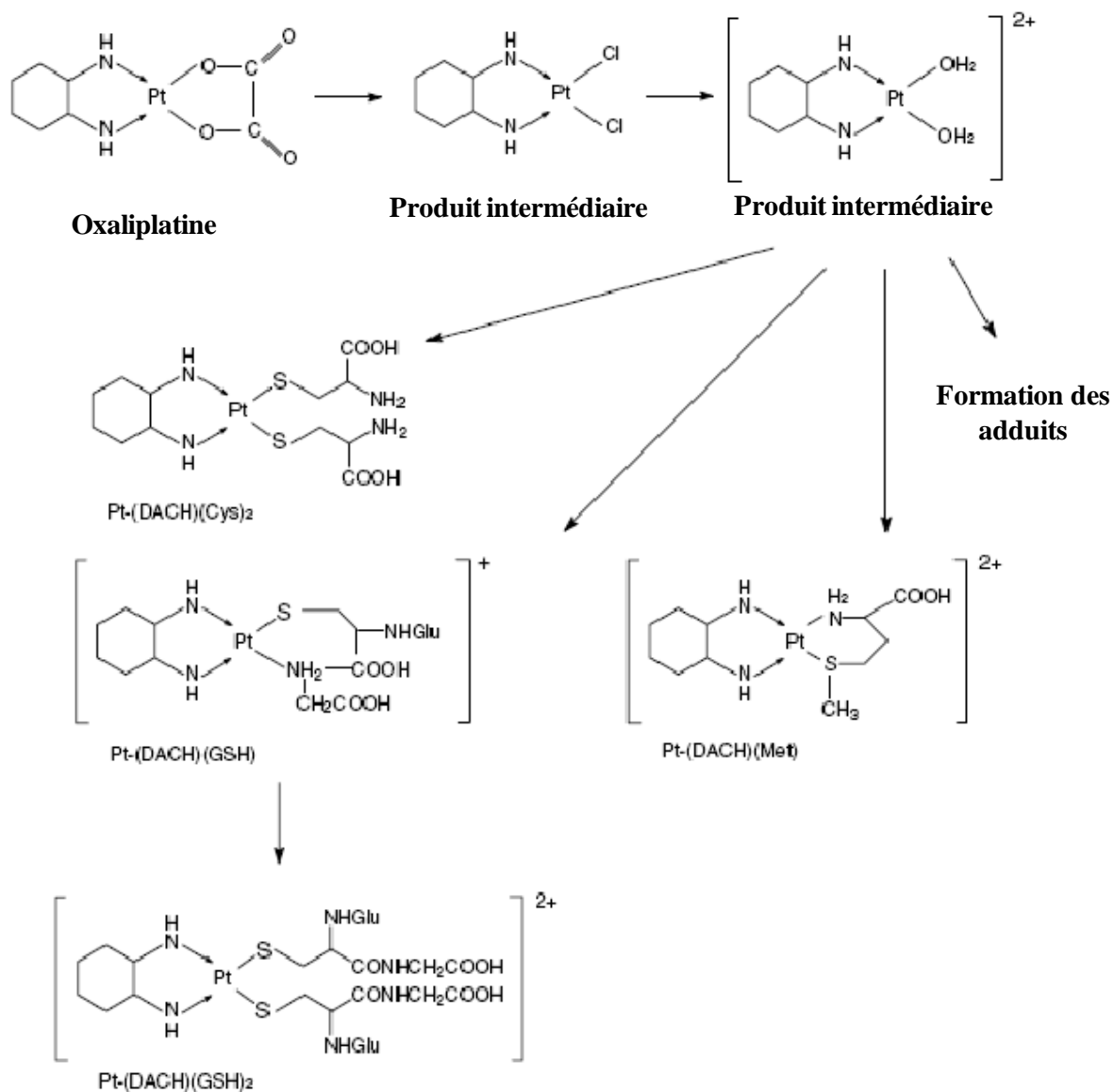
molécule avant que les dommages au niveau de l'ADN soient réalisés. Cette réaction de conjugaison est suivie par une réaction d'élimination extracellulaire du médicament qui va donc renforcer la résistance au traitement. Le rôle clé de la GST dans la résistance ainsi que son implication dans la survenue des toxicités à l'Oxaliplatine ont été confirmés par un important nombre d'études.

### Réparation des adduits

Parmi les cinq systèmes intervenant dans la réparation des dommages produits au niveau de l'ADN (**NER** – *Nucleotide Excision Repair*, **MMR** – *Mismatch Repair*, **BER** – *Base Excision Repair*, **DSBR** – *Double-Strand Break Repair* et **DR** – *Direct Repair*), les systèmes de réparation d'ADN par excision des nucléotides/bases semblent jouer un rôle important dans la gestion de la résistance à une chimiothérapie à base de l'Oxaliplatine dans le traitement du cancer colorectal. L'induction des enzymes impliquées dans ces systèmes est responsable d'une augmentation de l'activité réparatrice manifestée par une élimination plus importante des adduits créés, expliquant donc la diminution de la sensibilité cellulaire au médicament.

#### **I.2.3.4. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance/toxicité à l'Oxaliplatine : Système de détoxification cellulaire**

Le processus de détoxification cellulaire de l'Oxaliplatine résulte suite à une liaison des dérivés de platine aux différentes biomolécules comme la méthionine, la cystéine et le glutathion (Figure I.24).



**Fig. I.24. Hydrolyse non-enzymatique [d'après Kwekel *et al.*, 2005]**

La voie du glutathion est essentielle dans la détoxification des composés endogènes ou exogènes au sein de la cellule. La réaction de détoxification par cette voie est sous le contrôle des enzymes de la famille des glutathiones S-transférases. Les études sur les cellules résistantes à l'Oxaliplatine ont porté notamment sur cette voie. Des lignées cellulaires de carcinomes ovariens (A2780) ont été adaptées à l'Oxaliplatine avec différentes concentrations. Des mesures réalisées par CLHP (Chromatographie liquide haute performance) ont indiqué un taux de GSH trois fois supérieur dans ces cellules par rapport aux cellules parentales [Akawi *et al.*, 1996]. Une augmentation de la conjugaison de l'Oxaliplatine semble donc faire partie d'un de ses mécanismes de résistance.

### ***1.2.3.4.1. GSTs (Glutathion-S-transférases)***

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une superfamille des enzymes métaboliques de phase II, qui jouent un rôle très important dans le système de défense cellulaire. Ces enzymes catalysent la réaction de conjugaison des molécules toxiques ou des carcinogènes avec le glutathion, protégeant ainsi la cellule contre les dommages [Boyer *et al.*, 1985]. Plusieurs rapports indiquent que les enzymes GST sont responsables de la cytotoxicité des certaines molécules chimiothérapeutiques [Chao *et al.*, 1992]. Cinq sous-classes des enzymes GSTs ont été déjà décrites dans la littérature :  $\alpha$  (GSTA),  $\pi$  (GSTP),  $\mu$  (GSTM),  $\theta$  (GSTT) et  $\sigma$  (GSTS) [Board *et al.*, 1997].

### **GSTP**

Les enzymes de la classe GSTP sont exprimées notamment dans les tissus normaux épithéliaux, mais il a été démontré qu'elles sont surexprimées dans le cancer colorectal [Moscow *et al.*, 1989]. Ces enzymes interviennent également dans la détoxification des dérivés du platine [Goto *et al.*, 1999]. La GSTP détoxifie le CDDP et une corrélation a été établie entre l'augmentation de l'expression de la GSTP et l'augmentation de la formation du conjugué platine-GSH [Goto *et al.*, 1999]. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence quelques années plus tard l'existence d'une accumulation nucléaire de GSTP, en réponse au CDDP, dans des lignées coliques humaines, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité de ces cellules en présence d'un inhibiteur de GSTP [Goto *et al.*, 2002]. Pour les enzymes de la classe de GSTP1, plusieurs polymorphismes ont été décrits dans la littérature. Il s'agit d'un polymorphisme Ile105Val résultant de la transition d'un A en G au niveau du codon 105 et un deuxième polymorphisme Ala114Val produit par la transition d'un C en T dans le codon 114 [Ali-Osman *et al.*, 1997]. Trois isoformes ont été remarquées pour la GSTP1 : le variant « sauvage » A (Ile105, Ala114), le variant « muté » B (Val105, Ala114) et le variant « muté » C (Val105, Val114). Ces variations génétiques ont un impact sur l'activité enzymatique. Il a été démontré à côté de cela que l'activité lymphocytaire GSTP1 était plus basse chez les homozygotes B/B que chez les homozygotes A/A [Stoehlmacher *et al.*, 2002]. Généralement, la forme mutante de l'enzyme GSTP1 possède une activité diminuée de détoxification des carcinogènes. De plus, dans une étude portant sur des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités avec l'association 5-FU/Oxaliplatine, les patients possédant deux allèles mutés ont révélé une augmentation de la survie (24mois) par rapport aux patients avec deux allèles non-mutés (7,9 mois) [Stoehlmacher *et al.*, 2004]. Par contre, des études

## CHAPITRE 1

antérieures n'ont pas trouvé des corrélations entre ces polymorphismes pour le cancer colorectal [Raymond *et al.*, 1998b].

### **GSTM**

Par rapport aux membres de la classe des GSTP, les enzymes GSTM et GSTT peuvent être impliquées dans le développement de certains types de cancers, ainsi que dans la réponse au traitement altérant l'ADN. Les protéines glutathion S-transférase mu (GSTM) sont des isoenzymes cytosoliques dimériques. Elles catalysent la conjugaison du glutathion sur une grande variété de carcinogènes électrophiles. Le gène *GSTM1* est localisé sur le chromosome 1p13. Pour ce gène les polymorphismes les plus étudiés sont représentés par la variation nucléotidique (G2619C) et une délétion complète du gène *GSTM1*. Ces polymorphismes sont responsables de la présence de trois allèles nommés : *GSTM1*\*A, *GSTM1*\*B et *GSTM1*\*0. Les deux premiers diffèrent par une seule base au niveau de l'exon 7 qui ne semble pas affecter l'activité de l'enzyme. En revanche, la présence de l'allèle nul *GSTM1*\*0 se traduit par l'absence de l'enzyme GSTM1. Les sujets porteurs de la délétion du gène *GSTM1* semblent incapables de métaboliser des époxydes ou des quinones [Hayes *et al.*, 1995]. Chez les caucasiens, la fréquence de l'allèle nul *GSTM1*\*0 est d'environ 35-60% [Kato *et al.*, 1996]. Par son polymorphisme, il paraît être un gène de susceptibilité pour le cancer du poumon, du côlon et de la vessie [Fontana *et al.*, 1997]. Dans le cancer du sein, le gène *GSTM1* semble induire une protection des cancers de la glande mammaire [Fontana *et al.*, 1997]. Les études réalisées dans le cancer colorectal ont présenté des résultats assez contradictoires. L'équipe de Stoehlmacher n'a trouvé aucune corrélation entre la survie ou la réponse au traitement des patients atteints d'un cancer colorectal avancé et traités avec l'association 5-FU/Oxaliplatine, et les polymorphismes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* [Stoehlmacher *et al.*, 2002 ; Stoehlmacher *et al.*, 2004]. Ces résultats ont confirmé ceux obtenus quelques années auparavant [Kato *et al.*, 1996]. Par contre, dans d'autres études, il a été indiqué que les porteurs d'un génotype *GSTM1*\*0/\*0 sont associés au risque du cancer colorectal [Deakin *et al.*, 1996 ; Chevenix-Trench *et al.*, 1995 ; Strange *et al.*, 1991].

### **GSTT**

La classe des enzymes GSTT1 est localisée au niveau du chromosome 22 [Webb *et al.*, 1996]. Même si ces enzymes manifestent *in vitro* une activité catalytique contre une grande diversité d'agents exogènes et endogènes, la vraie fonction *in vivo* de ces enzymes reste mal connue. Il est connu par contre que le gène codant pour *GSTT1* présente des polymorphismes,

notamment des délétions (*GSTT1\*0*) qui sont responsables d'une perte complète de l'activité de l'enzyme chez les patients homozygotes mutés. La fréquence du génotype nul est de 20 % dans la population caucasienne

D'une manière générale, les résultats obtenus pour les enzymes appartenant aux classes GSTM1 et GSTT1 semblent montrer que leur rôle dans le cancer colorectal est moins important que celui des enzymes GSTP.

### **I.2.3.5. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance à l'Oxaliplatine : Système de réparation par excision de nucléotides (NER)**

Le NER est le système de réparation le plus flexible parmi tous les autres mécanismes de réparation, grâce à son aptitude à éliminer tout un panel de lésion au niveau d'ADN. Cette voie répare les lésions créées par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et est particulièrement importante pour la réparation des adduits créés au niveau de l'ADN par différents agents chimiothérapeutiques comme le Cisplatine et l'Oxaliplatine [Raymond *et al.*, 2002 ; Smith *et al.*, 1996].

#### **Étapes du mécanisme de NER**

Les mécanismes de réactions de NER ont été élucidés en détails à l'aide de protéines purifiées et de systèmes reconstitués. Le processus de NER implique l'action d'environ 24-32 protéines dans des étapes successives, notamment la reconnaissance des dommages, l'ouverture locale de l'ADN double brin suivi par l'excision du brin endommagé des deux côtés de la lésion (Figure I.25).

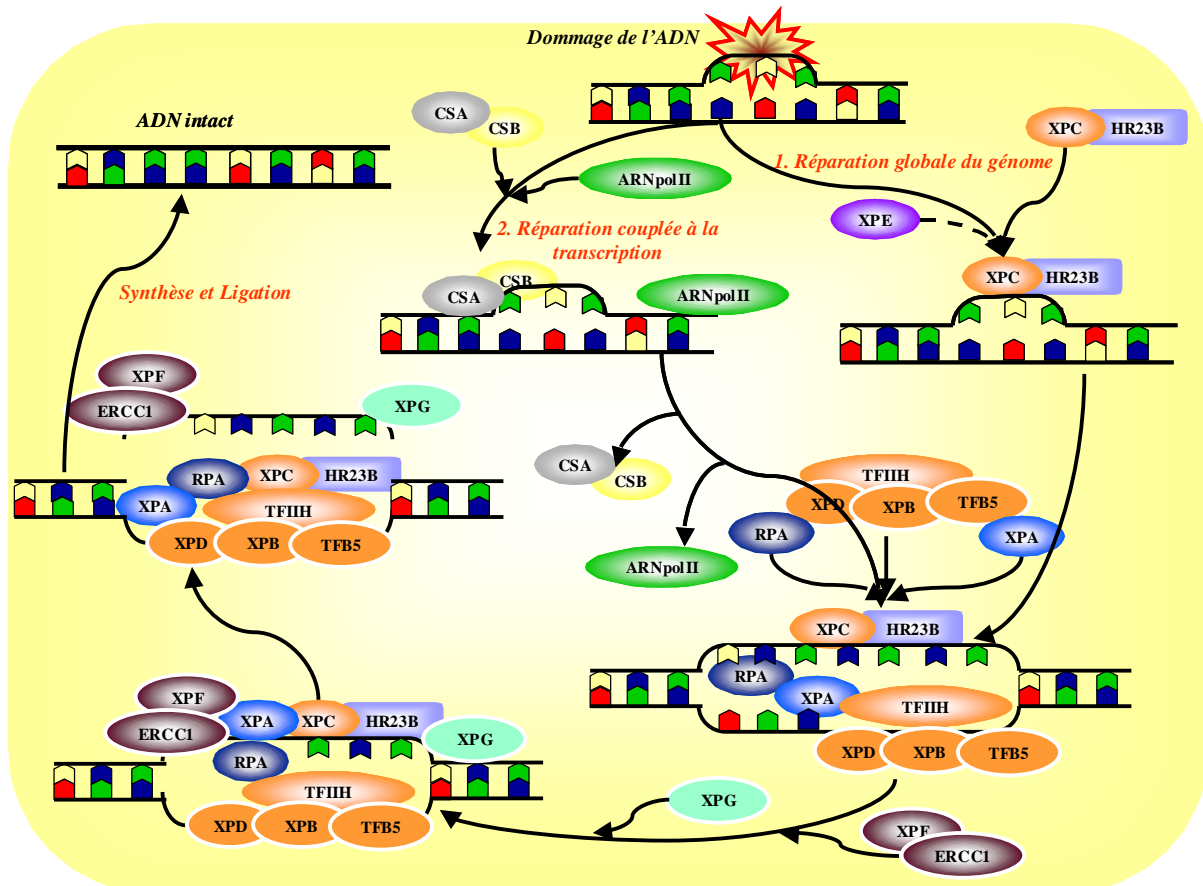


Fig. I.25. Système NER

Dans l'étape de reconnaissance de dommage de l'ADN, différentes études ont établi que la formation du complexe XPC (*Xeroderma Pigmentosum group C complementing protein*) – hHR23B est le point initial qui permettra par la suite le recrutement des différents facteurs de réparation [Sugasawa *et al.*, 1998]. D'autres protéines, comme XPF (*Xeroderma Pigmentosum group F*) et XPA (*Xeroderma Pigmentosum group A*), peuvent intervenir dans l'étape de reconnaissance des dommages, sachant que XPF manifeste une grande affinité pour les lésions produites par les rayons UV [Keeney *et al.*, 1993] et XPA, associée à la protéine RPA (*Replication Protein A*), se lie préférentiellement à l'ADN endommagé [Buschta-Hedayat *et al.*, 1999].

Après la reconnaissance de la lésion, le complexe TFIIH, qui contient parmi ses sous-unités les hélicases XPB (*Xeroderma Pigmentosum group B*) et XPD (*ERCC2 : Excision Repair Cross Complementation group 2*), est impliqué dans l'ouverture locale de l'ADN autour de site endommagé. Cette étape d'ouverture de l'ADN est suivie du clivage en 3' et 5' du brin contenant la lésion. Les endonucléases XPG et le complexe ERCC1-XPF sont responsables de l'élimination d'un fragment de 24 à 32 paires de bases, contenant la partie

endommagée. Le fragment éliminé est resynthétisé dans la réaction de resynthèse de l'ADN, contrôlée par les polymérases réplcatives [de Laat *et al.*, 1999 ; Dip *et al.*, 2004].

### **Deux voies différentes de réparation de l'ADN par excision des nucléotides**

La réparation de l'ADN par excision des nucléotides peut se réaliser en deux modes : une voie générale de réparation au niveau du génome (*Global Genome Repair* ou *GG-NER*) et une autre voie couplée à la transcription (*transcription-coupled repair* ou *TC-NER*). Ces deux voies font appel dans la plupart des cas aux mêmes enzymes, mais elles diffèrent par la modalité de reconnaissance des dommages de l'ADN. La voie générale de réparation au niveau du génome est une voie plus lente, qui corrige les brins d'ADN dans le reste du génome. Par ailleurs, la voie de réparation couplée à la transcription intervient préférentiellement dans la correction des brins modèles de gènes activement transcrits [Mellon *et al.*, 1987]. Un brin modèle se réparerait pendant la transcription de l'ADN, et la lésion peut être signalée par une ARN polymérase bloquée.

Les protéines intervenant dans la reconnaissance des lésions sont différentes dans les deux voies. Dans la voie de réparation de l'ADN au niveau du génome, la détection des dommages est réalisée par le complexe XPC/hHR23B [Sugasawa *et al.*, 1998]. Il a été par ailleurs montré que ces facteurs sont les seuls qui n'interviennent pas dans la voie de réparation couplée à la transcription [Venema *et al.*, 1991] (Figure I.25).

En même temps, dans la voie de réparation couplée à la transcription, le complexe d'ARN polymérase II est impliqué dans la détection des dommages de l'ADN et recrute au cœur de NER toutes les protéines de réparation [Mu *et al.*, 1991], mais aussi CSA et CSB (*Cockayne syndrome complementation group A* et *group B*). En regardant l'implication des protéines CSA et CSB dans le processus de réparation couplé à la transcription, une étude de 1995 a mis en évidence que les cellules déficientes en CSA ou CSB sont aussi déficientes en TC-NER [Henning *et al.*, 1995]. D'autres études ont montré l'implication des protéines CS dans le blocage de l'activité de l'ARN polymérase II par le recrutement d'autres systèmes de réparation de l'ADN, en déclenchant ainsi le processus de réparation couplé à la transcription [Cooper *et al.*, 1997]. Cependant, le rôle précis de CSA et CSB dans le processus de réparation couplé à la transcription n'est pas clairement établi.

L'ouverture des deux brins d'ADN autour de dommage dans les deux voies est réalisée à l'aide des hélicases XPD et XPB. La stabilisation de l'ouverture est sous le contrôle



de RPA et XPA [Evans *et al.*, 1997]. XPG et le complexe ERCC1/XPF couperont l'ADN altéré et les facteurs de réplication synthétiseront un nouveau fragment.

### ***1.2.3.5.1. Nucléases de NER***

Le rôle critique dans la maintenance de l'intégrité du génome est remarqué par le fait que des variations génétiques au niveau de certains gènes de NER sont à la base de maladies génétiques autosomiques récessives comme le Xeroderma Pigmentosum (XP). Il s'agit d'une maladie caractérisée par une sensibilité excessive de la peau au soleil, une pigmentation anormale, des troubles oculaires, ainsi qu'une prédisposition à développer un cancer de la peau ou d'autres maladies malignes [Cleaver *et al.*, 2005 ; Lehmann *et al.*, 2003]. Les mutations au niveau de XPB et XPD ont été corrélées avec la Trichothiodystrophie (TTD) qui est également caractérisée par une sensibilité aux UV, des cheveux cassants formant des nœuds et ayant des extrémités en brosse, des retards physiques et mentaux, une photosensibilité sans prédisposition au cancer [Bergmann *et al.*, 2001]. Comme indiqué auparavant, le système de réparation couplé à la transcription est défectueux dans le Syndrome de Cockayne. Cette maladie se manifeste aussi par une sensibilité aux UV, un dysfonctionnement neurologique, un retard staturo-pondéral et de la cataracte.

### ***ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1)***

Une étude de 2007 a exposé pour la première fois le cas d'un patient avec une déficience en ERCC1. Ce patient présentait un sévère retard du développement, ainsi que des caractéristiques morphologiques très similaires au syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique [Jasters *et al.*, 2007]. Jusqu'à la publication de ce rapport, la plupart des informations sur l'importance de l'enzyme d'ERCC1 ont été basées sur des observations provenant de lignées cellulaires équipées avec un système de NER artificiel déficient et des modèles des souris déficientes (knockout). Par exemple, la lignée cellulaire humaine de cancer ovarien C200 a montré une résistance au Cisplatine, due à l'augmentation de l'activité de NER et à la surexpression d'ERCC1 [Ferry *et al.*, 2000]. Par contre, les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), déficientes en ERCC1, ont été plus sensibles au traitement avec le Cisplatine [Meyn *et al.*, 1982]. En sachant que l'efficacité du processus de NER est comparable entre le Cisplatine et l'Oxaliplatine, ERCC1 peut être considéré comme un facteur important de la sensibilité à l'Oxaliplatine. Dans d'autres lignées cellulaires humaines, cette fois-ci provenant de cancer des testicules (833K et CGT27), la grande sensibilité au Cisplatine a été corrélée avec des bas niveaux d'expression de XPA et de XPF-ERCC1 [Koberle *et al.*, 1999]. Une

## CHAPITRE 1

autre étude réalisée sur un panel de six lignées cellulaires de cancer du colon a mis en évidence que le niveau d'ARNm d'ERCC1 est prédictif pour la sensibilité à l'Oxaliplatine [Arnould *et al.*, 2003].

ERCC1 est une enzyme très conservée spécifique du NER, et dont l'absence est létale. Cette observation a été confirmée par des travaux réalisés sur des souris déficientes en ERCC1. Ces souris sont extrêmement petites à la naissance et meurent 3 semaines après. Leur mort est due à une insuffisance hépatique, mais il a été remarqué également une altération du système nerveux central et des reins [Chipchase *et al.*, 2003 ; Gossage *et al.*, 2007].

Le gène d'*ERCC1* est localisé sur le chromosome 19q13.2-q13.3, comprend 10 exons et compte environ 15kb du génome. La protéine d'ERCC1 contient 297 acides aminés et comporte deux domaines : un domaine central conservé - dépourvu de l'activité nucléase - et un domaine C-terminal. Le domaine central semble être responsable de l'interaction avec XPA [Li *et al.*, 1994], pendant que le domaine C-terminal d'ERCC1 interagit avec le domaine C-terminal de XPF [de Laat *et al.*, 1998]. Cependant il peut se lier aussi à l'ADN (Figure I.26).

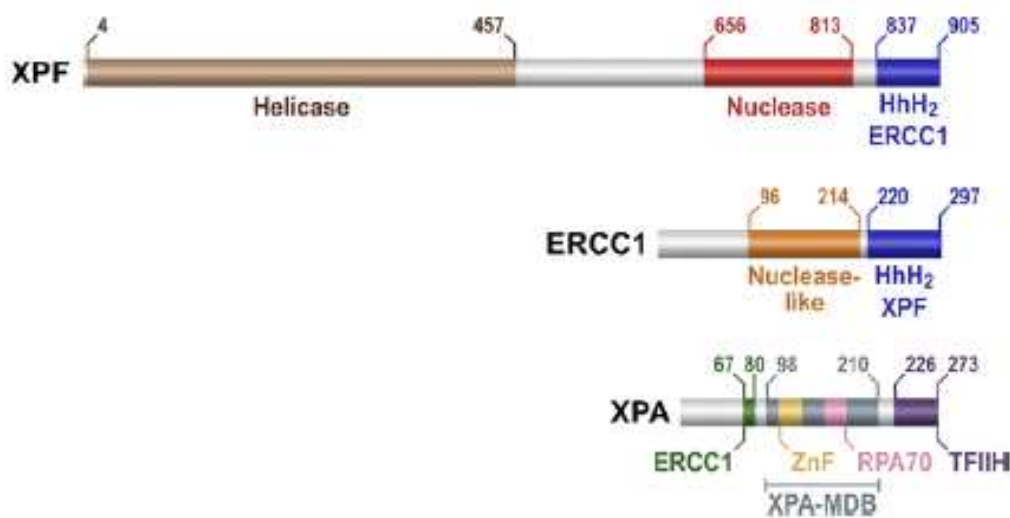


Fig. I.26. Domaines de reconnaissance de XPF, ERCC1 et XPA [d'après Croteau *et al.*, 2008]

Beaucoup d'études cliniques ont suggéré qu'ERCC1 pourrait être un important facteur prédictif et/ou pronostique des cancers. Certains auteurs, qui se sont intéressés à l'expression d'ARNm d'ERCC1 ou à l'expression de la protéine dans les tumeurs, ont trouvé une corrélation entre ces expressions et la réponse tumorale au traitement [Arnould *et al.*, 2003 ; Vallbohmer *et al.*, 2006 ; Kwon *et al.*, 2007]. Une autre étude, portant sur des patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par Oxaliplatine et 5-FU, a montré que le pronostic

## CHAPITRE 1

des patients dont les tumeurs expriment de faibles niveaux d'ARNm d'ERCC1 et de TS était meilleur [Shirota *et al.*, 2001].

D'autres travaux de recherche assez récents ont eu comme but d'approfondir le rôle des polymorphismes génétiques d'ERCC1 comme facteurs prédictifs de la résistance à l'Oxaliplatine.

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés pour le gène d'ERCC1. Deux SNP parmi ces variants génétiques ont été plus particulièrement étudiés. Il s'agit du SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) T19007C touchant le codon 118 (exon 4) et qui représente un polymorphisme conservatif d'un seul nucléotide résultant, soit d'une cytosine (codon AAC correspondant à 60% des allèles, nommés allèles C), soit d'une thymine (codon AAT correspondant à 40% des allèles, nommés allèles T), les 2 séquences codant pour une asparagine. Le codon AAT est un codon rare traduit de façon moins efficace. Par rapport au codon AAC, le codon AAT est reconnu 10 à 100 fois moins efficacement par les ARNt qui vont s'associer assez faiblement à la séquence trinuécléotidique muté. La mutation silencieuse de codon 118 semble être associée à un haut niveau d'expression d'ARNm et de la protéine d'ERCC1 [Yu *et al.*, 1997 ; Yu *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2008]. Un autre polymorphisme qui a fait l'objet de certaines études est le polymorphisme C8092A qui est localisé au niveau de la région 3'UTR du gène et qui a été décrit comme affectant la stabilité d'ARNm d'ERCC1 [Chen *et al.*, 2000]. Il semble donc que ce n'est pas une conséquence fonctionnelle des mutations qui sont en cause, mais plutôt une conséquence transcriptionnelle, voir traductionnelle.

D'une manière générale il a été indiqué que ces polymorphismes ont une influence sur la réponse au traitement dans le cancer colorectal. Une série portant sur 32 patients atteints de cancer colorectal métastatique a montré que le taux d'ARNm d'ERCC1 était plus fréquemment augmenté chez les homozygotes T/T que chez les homozygotes C/C, les hétérozygotes étant en situation intermédiaire. En comparant le groupe de patients ayant un allèle C au groupe n'en comprenant pas, cette différence apparaissait significative, suggérant que le polymorphisme du codon 118 est associé à une modulation de l'expression d'ERCC1 dans le cancer colorectal [Park *et al.*, 2003]. Les chimiothérapies provoquant des lésions réparées par le NER seraient alors plus efficaces. Ce polymorphisme a été également étudié dans les tissus normaux des 91 patients avec un cancer colorectal métastatique et traités avec l'association 5-FU et Oxaliplatine [Viguié *et al.*, 2005]. La réponse objective au traitement a été significativement augmentée chez les patients T/T par rapport aux patients C/T ou C/C.

## CHAPITRE 1

Ces résultats ont été en accord avec d'autres études publiés auparavant [Stoelmacher *et al.*, 2004].

Plus récemment, de nouveaux polymorphismes ont été décrits, comme G19716C, A17677C et G15310C [Moreno *et al.*, 2006], mais leurs implications cliniques ne sont pas encore évaluées.

### **XPF (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group 4*)**

Comme ERCC1 interagit avec XPF(ERCC4) pour former le complexe XPF-ERCC1, il n'est pas surprenant que les cellules déficientes en XPF manifestent une sensibilité similaire aux agents comme le Cisplatine ou l'Oxaliplatine à seuls des cellules déficientes en ERCC1. De plus, il a déjà été montré que les cellules déficientes en ERCC1 ou XPF manifestaient une sensibilité augmentée aux sels des platines, par rapport aux cellules déficientes dans d'autres facteurs de NER [Hoy *et al.*, 1985]. Des recherches réalisées sur les cellules humaines KCP-4 qui présentaient une surexpression de XPF montrent une résistance de celles-ci à l'Oxaliplatine et au Cisplatine [Mukai *et al.*, 2002]. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés pour le gène de XPF, et les plus fréquents se situent au niveau des exons 8 et 11 [Fan *et al.*, 1999]. En ce qui concerne les polymorphismes au niveau de l'exon 11, il a été mis en évidence le fait qu'ils empêchent la formation du complexe XPF-ERCC1, étant ainsi responsables de la dégradation rapide d'ERCC1 [Matsumura *et al.*, 1998].

### **XPD (*Xeroderma pigmentosum groupe D*)**

Un autre membre essentiel de la voie de réparation par excision des nucléotides, est le gène *XPD* (ERCC2) [Sung *et al.*, 1993]. Il code pour une hélicase, composant important du facteur de transcription TFIIH. ERCC1 et XPD sont séparés par moins de 250kpb au niveau de chromosome 19q13.2-13.3, suggérant donc une liaison proche dans les fonctions de réparation de l'ADN [Dabholkar *et al.*, 1995]. En outre, certaines études ont mis en évidence des polymorphismes de XPD comme étant impliquées dans la pathogenèse des différents types de cancers. Il s'agit des SNP comme H201Y, D312N et K751Q qui ont été associés notamment aux cancers du poumon [Li *et al.*, 2001 ; Spitz *et al.*, 2001 ; Hu *et al.*, 2004]. Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré le rôle des polymorphismes D312N et K751Q comme facteurs prédictifs de la réponse et même de la toxicité suite à une chimiothérapie à base de l'Oxaliplatine [Park *et al.*, 2001 ; Boige *et al.*, 2010]. L'étude d'Allan et de ses collaborateurs a souligné que les patients homozygotes mutés pour la mutation K751Q de XPD possèdent un risque augmenté de développer une leucémie myéloïde aiguë après la chimiothérapie [Allan *et*

## CHAPITRE 1

*al.*, 2004]. Cependant, tous ces résultats restent controversés. Dans une étude relativement récente, les auteurs ont conclu que ces deux variantes génétiques de XPD ne montrent pas un effet évident sur l'activité de NER [Clarkson *et al.*, 2005]. Par contre, dans la même étude, l'équipe a mis en relief que les codons affectés par les SNP sont généralement localisés dans des régions qui ne sont pas fortement conservées entre les différentes espèces. Cela pourrait expliquer pourquoi ces polymorphismes sont des mauvais candidats pour engendrer les conséquences fonctionnelles [Clarkson *et al.*, 2005].

### **XPB (*Xeroderma Pigmentosum* groupe B)**

La XPD n'est pas la seule hélicase qui intervient dans le processus de NER. XPB (ERCC3) joue aussi un rôle important dans l'étape de réparation de l'ADN par excision des nucléotides et dans la transcription [Coin *et al.*, 1998]. Le gène de XPB est localisé sur le chromosome 2q et code pour une hélicase ATP-dépendante [Roy *et al.*, 1994]. Comme XPD, XPB fait partie des sous-unités de TFIIH. Par rapport à l'XPD qui possède une activité 5'→3', XPB est une hélicase avec une activité inverse 3'→5', les deux intervenant dans le processus de réparation dans l'étape de l'ouverture de l'ADN, des deux côtés du dommage. Pour le gène de XPB deux polymorphismes ont été décrit au sein d'une population de patients polonais [Butkiewicz *et al.*, 2000]. Il s'agit d'un polymorphisme au niveau du l'exon 3 (A445G) et d'un autre au niveau de l'exon 8 (G1299T). Pourtant, la fréquence d'apparition de ces deux mutations reste rare et à l'heure actuelle aucune étude n'a pas mis en évidence une association entre ces polymorphismes de XPB et la survenue des cancers.

### **XPA (*Xeroderma Pigmentosum* groupe A)**

Un autre gène qui entre en jeu dans l'étape précoce de la réparation des dommages de l'ADN est XPA. Le gène de XPA code pour une protéine de 31kDa qui a la propriété de se lier plus à l'ADN endommagé qu'à l'ADN intact. Il a été déjà montré que XPA interagit avec RPA, XPF-ERCC1 mais aussi avec TFIIH, jouant donc un rôle central dans le positionnement correct du complexe de réparation autour de l'ADN endommagé [Park *et al.*, 1994]. Pour le gène de XPA deux polymorphismes ont été identifiés: un au niveau du codon 23, dans la région 5'UTR (A23G) et un deuxième au niveau de l'exon 6 (G709A) [Butkiewicz *et al.*, 2000]. Par contre, il a été déjà signalé que ces deux polymorphismes ne sont pas responsables d'une augmentation de l'expression d'ARNm de XPA dans les cancers ovariennes résistantes au Cisplatine [States *et al.*, 1997]. En même temps, les patients porteurs d'au moins un allèle muté ont présenté une médiane de survie inférieure (21,5 mois avec  $p = 0,03$ ) par rapport aux

## CHAPITRE 1

patients présentant deux allèles non-mutées (11,3 mois avec  $p = 0,05$ ) [Adewole *et al.*, 2006]. Cependant, pour le cancer colorectal, les résultats obtenus sont assez contradictoires. Une étude de Monzo *et al.*, a montré que le polymorphisme au niveau de la région 5'UTR de XPA combiné avec le polymorphisme de XPG peuvent être des facteurs pronostiques importants pour les patients recevant une chimiothérapie à base d'Oxaliplatine et 5-FU [Monzo *et al.*, 2007]. Les patients porteurs d'au moins d'un allèle muté ont montré une survie plus longue par rapport aux patients homozygotes mutés pour la variante génétique 5'UTR. En même temps, une étude d'une équipe danoise a montré que le SNP dans la région 5'UTR de XPA, ainsi que le polymorphisme Lys751Gln de XPD ne jouent pas un rôle majeur dans la carcinogenèse colorectale [Hansen *et al.*, 2007].

### **I.2.3.6. Facteurs pharmacogénétiques associés à la résistance à l'Oxaliplatine : Système de réparation par excision des bases (BER)**

La voie de réparation par excision des bases intervient dans la réparation des petites lésions, dues soit à des bases éliminées par dépurination, soit à des bases endommagées par désamination oxydative, oxydation ou méthylation.

#### **Etapes du mécanisme de BER**

La liaison N-glycosidique dans laquelle est engagée la base inappropriée est hydrolysée par les enzymes ADN-glycosylases, ce qui crée un site AP (A-purique, P-pyrimidique) sur l'ADN, soit un trou d'une base. Il existe de nombreuses ADN-glycosylases identifiés chez l'homme, spécifiques pour chaque type de lésion [Wood *et al.*, 2001]. Par exemple, l'uracile-glycosylase corrige la désamination la plus fréquente, celle de la cytosine en uracile. La désamination de 5-méthyl cytosines des doublets CG aboutit à la formation de thymines. Une ADN-glycosylase particulière reconnaît spécifiquement le mésappariement TG et élimine T. Cependant, l'efficacité de ce système est loin d'être totale. Aussi les mutations ponctuelles de l'ADN concernent-elles souvent les cytosines méthylées : il s'agit de points chauds (Hot-spots) de mutation.

La liaison phosphodiester en 5' du site AP est hydrolysée par une AP endonucléase, qui clive le squelette sucre-phosphate du brin portant la lésion. Il se forme alors deux extrémités intra-chaînes : 5'-déoxyribose-phosphate et 3'OH. Dans ce contexte, deux voies de synthèse réparatrice sont alors possibles : une voie de réparation par brèche courte ou une voie de réparation par brèche longue [Moussard *et al.*, 2005].

### Deux voies différentes de réparation de l'ADN par excision des bases

Pendant la voie de réparation par brèche courte (*SP-BER* ou *Short-patch BER*), l'ADN polymérase  $\beta$  ajoute 1 nucléotide à l'extrémité 3'-OH de la brèche, grâce à son activité polymérase. Puis, grâce à son activité désoxyribose-phosphodiésterase (dRPase), cette enzyme hydrolyse la liaison phosphodiester en 3' du site AP, libérant le désoxyribose-phosphate. La re-synthèse de la base est effectuée par une ADN polymérase  $\beta$ . Finalement, l'ADN ligase III lie par une liaison phosphodiester le « bon » nucléotide au nucléotide suivant et rétablit la continuité du brin réparé [Moussard *et al.*, 2005].

Dans la voie de réparation par brèche longue (*LP-BER* ou *Long-patch BER*), un fragment plus long d'ADN (2 à 12 nucléotides) est excisé et ré-synthétisé [Fortini *et al.*, 2003]. La brèche au niveau du brin d'ADN est reconnue par la poly-ADP ribose polymérase (PARP) et la réparation est initiée par le complexe polynucléotide kinase (PNK), XRCC1. Dans cette voie, le complexe ADN polymérase et PCNA (*Proliferation cell nuclear antigen*) catalyse la réaction de synthèse. Il a été montré que pendant la phase de synthèse, le premier nucléotide incorporé est réalisé à l'aide de la polymérase  $\beta$ , pendant que les polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$  participent à l'incorporation des autres nucléotides [Fortini *et al.*, 2003]. FEN1 (*Flap structure-specific endonuclease 1*) et la DNA ligase I terminent la réparation.

XRCC1 joue un rôle très important dans le bon fonctionnement du BER vu que cette protéine positionne le système enzymatique à l'endroit de la réparation.

#### ***1.2.3.6.1. XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1)***

XRCC1 est une protéine plateforme qui joue un rôle de coordination dans différentes étapes de réparation réalisées par le système BER (*Base Excision Repair*) [Marsin *et al.*, 2003]. Cette enzyme contient un domaine qui fonctionne comme une interface protéine-protéine, lui permettant d'interagir avec divers partenaires de la machinerie de BER comme la polymérase poly(ADP-ribose) (PARP), Pol $\beta$ , Lig3 $\alpha$ , APE, PNK [Campalans *et al.*, 2005]. XRCC1 est recruté au niveau du site endommagé à l'aide de certains ADN-glycosylases, des AP-endonucléases ou par PARP, et reste au niveau de la lésion jusqu'à la fin de la réparation en coordonnant tout le processus. Pendant toute cette période, XRCC1 facilite l'échange entre les ADN-glycosylases et les AP-endonucléases. Il est ainsi à l'origine d'une augmentation de taux d'excision au niveau de la base modifiée, intervient aussi dans la régulation de l'interaction entre pol $\beta$  et APE1 et finalement active l'étape de ligation [Marsin *et al.*, 2003].

## CHAPITRE 1

Plus de 60 SNP ont été identifiés au niveau du gène de *XRCC1*. Parmi ceux-ci, trois sont plus particulièrement étudiés : Arg194Trp, Arg280His et Arg399Gln [Hung *et al.*, 2005].

Le polymorphisme localisé au niveau du codon 10 du gène entraîne un changement d'une Arg399 par une Gln. Cette substitution se produit dans le domaine de liaison de PARP (les acides aminés 301-402). La forme mutée de l'enzyme est ainsi moins capable d'initier le processus de réparation d'ADN dû à cette altération du site de fixation. Il a été mis en évidence que les patients avec une variante génétique mutée d'*XRCC1* ont montré une augmentation de la tolérance vis-à-vis des dommages de l'ADN tout en présentant un système de réparation défectueuse [Duell *et al.*, 2000].

Dans le cancer colorectal métastatique, les patients traités avec l'association 5-FU/Oxaliplatine et présentant au moins un allèle muté pour *XRCC1* ont manifesté un risque d'échec à la chimiothérapie cinq fois plus important que les patients présentant deux allèles non-mutés [Stoehlmacher *et al.*, 2001]. Des observations similaires ressortent d'une étude coréenne plus récente qui a montré que le polymorphisme Arg399Gln d'*XRCC1* est un facteur pronostic significatif pour la réponse à une chimiothérapie FOLFOX, ainsi que pour la survie sans progression [Suh *et al.*, 2010].

Concernant les polymorphismes au niveau des codons 194 et 280, il n'y a pas d'évidence claire prouvant de corrélation avec une augmentation des dommages de l'ADN *in vivo* [Lunn *et al.*, 1999].

**En conclusion**, la sensibilité cellulaire est donc un processus complexe et multifactoriel et l'importance relative de chaque mécanisme vis-à-vis de la résistance à une molécule est difficile à prédire. Les variants génétiques codant pour les enzymes impliquées dans la conjugaison de l'Oxaliplatine, dans son accumulation intracellulaire, ainsi que dans la réparation des adduits créés par cette molécule, peuvent influencer la réponse cellulaire à ce médicament.

### ***1.3. Présentation du travail de thèse***

Le cancer colorectal, historiquement de mauvais pronostic, a fait au cours des années l'objet de nombreuses recherches qui ont changé sa prise en charge notamment par l'évaluation de nouvelles thérapies, la recherche de facteurs prédictifs de sensibilité à la chimiothérapie ou de nouveaux marqueurs de pronostic.



## CHAPITRE 1

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de recherche en cancérologie Nantes/Angers, dans l'Unité de Recherche INSERM U892, axe 12, sous la direction de Monsieur le Professeur Alain MOREL. Parmi les activités du laboratoire, une place importante est consacrée à la mise en œuvre des critères clinico-biologiques permettant l'optimisation de la réponse tout en limitant au maximum les effets secondaires délétères inhérents aux médicaments anticancéreux actuellement utilisés dans le traitement des cancers colorectaux, que se soit en situation adjuvante ou métastatique, pour chaque patient, afin de proposer une réelle personnalisation thérapeutique. 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 inutiles plus perte de chance sur la survie) et ceux qui développeront des toxicités inacceptables. Les résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui ont fait que notre Unité de Recherche soit reconnue sur le plan international dans ce domaine de recherche.

Dans le contexte de l'utilisation optimale des agents chimiothérapeutiques, la pharmacogénétique et la pharmacogénomique représentent deux voies majeures de recherche dont les concepts se sont très largement répandus ces dix dernières années et qui sont la base du rationnel du travail de notre thèse.

Ce mémoire est divisé en quatre parties. La première partie présente une synthèse sur le cancer colorectal et sur la pharmacogénétique des molécules « classiques » (5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine) utilisées dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

A l'heure actuelle, dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, ces trois agents thérapeutiques sont les plus efficaces, que se soit en monothérapie ou en combinaisons avec les nouvelles thérapies « ciblées ». Comme nous l'avons souligné dans le premier chapitre d'introduction, l'étude des altérations moléculaires a permis de mieux caractériser le cancer colorectal sur le plan épidémiologique, anatomopathologique et génétique. Aujourd'hui, l'analyse du polymorphisme enzymatique au niveau du promoteur de l'UGT1A1, ainsi que le dépistage génétique de la DPD, représente de réels outils d'aide dans la sélection de la meilleure stratégie de traitement utilisant le 5-FU et l'Irinotécan, portant notamment sur le choix du meilleur médicament administré à la bonne personne, avec une importante capacité d'anticiper et prévenir les phénomènes toxiques.

Cependant, l'influence de la plupart des variations génétiques des gènes sur l'efficacité des différentes associations thérapeutiques n'a pas été étudiée de manière exhaustive et n'a actuellement pas d'impact défini et claire sur les indications thérapeutiques.

## CHAPITRE 1

Il nous a paru donc évident dans le contexte scientifique d'individualisation thérapeutique de nous intéresser à ces trois molécules « classiques » (5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine), afin de chercher des associations entre les différents facteurs génétiques et l'apparitions de résistances ou de toxicités au traitement. Plusieurs enzymes ainsi que les conséquences sur le plan clinique d'éventuels polymorphismes à leurs niveaux, tant en terme d'efficacité que de toxicité, ont fait l'objet d'un grand nombre de communications et d'articles ces dernières années. Certaines de ces enzymes comme par exemple des enzymes intervenant dans la réparation de l'ADN (ERCC1, XPA, XPD, XPB, XRCC1), des enzymes de détoxification cellulaire (GSTP1, UGT1A1, UGT1A7, MTHFR, ABCG2...) ou encore des cibles des médicaments (TS) sont utilisées dans notre travail et seront discutées et détaillées dans les chapitres III et IV de cette thèse. L'objectif est de pouvoir envisager dans l'utilisation de ces « vétérans thérapeutiques » (notamment 5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine) un meilleur rationnel. Ainsi, l'association « au bon patient, au bon moment » des nouvelles molécules « ciblées », tels que les anticorps monoclonaux anti-EGFR, anti-VEGF, ne va faire que d'augmenter l'efficacité en terme de taux de réponses comme en terme de survie.

Les résultats obtenus seront présentés dans le troisième chapitre sous forme de quatre publications (qui sont actuellement soumissent à publication). La particularité de ces études cliniques rétrospectives est que nous avons cherché à isoler des facteurs prédictifs de toxicités et de réponses liés à des protocoles associant au 5-FU (qui est le traitement de référence), l'Irinotécan (protocole FOLFIRI) et l'Oxaliplatine (protocole FOLFOX). Dans ce contexte, nous avons introduit dans nos études les données de pharmacogénétiques propres pour chaque molécule. Les observations ressortant de ces études rétrospectives nous permettent d'envisager un rationnel dans la prise en charge des patients avec un cancer colorectal métastatique prenant en compte tant les toxicités prévisibles, mais aussi les possibilités thérapeutiques. Ces observations seront discutées dans la dernière partie de cette thèse.

Un autre point que nous avons visé au cours de cette thèse est la recherche de mutations de l'oncogène K-Ras, dont le statut mutationnel s'avère particulièrement important dans le cas de l'utilisation des thérapies « ciblées ». Toutefois, en tenir compte des données de la littérature qui montrent que le statut de K-Ras peut moduler l'expression d'ERCC1 - protéine du système NER et impliquée dans la résistance à l'Oxaliplatine- nous avons réalisé une étude *in vitro* sur des cellules présentant des mutations de Ras, afin d'analyser la relation entre Ras et ERCC1 après traitement à l'Oxaliplatine. Les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre III.2 et discutées dans le chapitre IV.2.

## **II. Patients, Matériels et Méthodes**

### ***II.1. Identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l'Irinotécan et à l'Oxaliplatine***

La pharmacologie des médicaments comme le 5-FU, l'Irinotécan et l'Oxaliplatine est compliquée du fait de la variabilité génétique des gènes cibles, des gènes intervenant dans le métabolisme, ainsi que ceux impliqués dans l'élimination du médicament. En effet, les différents polymorphismes génétiques peuvent être responsables d'une susceptibilité augmentée des toxicités ou à l'apparition de résistance au traitement.

De manière à établir s'il y a une association entre les mutations touchant des gènes codant pour des différentes enzymes avec un rôle important dans la pharmacologie de ces trois molécules et les résistances ou les toxicités, une méthode de miniséquençage luminométrique a été développée. Cette méthode a permis la détection des différentes mutations d'intérêt, dont l'apparition pourrait être responsable d'une modification de l'activité des enzymes chez les patients traités avec 5-FU, Irinotécan ou Oxaliplatine.

Deux études cliniques rétrospectives portées sur des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et recevant des traitements associant le 5-FU à l'Irinotécan ou à l'Oxaliplatine (dans des protocoles chimiothérapeutiques différents, notamment FOLFIRI et FOLFOX) ont été réalisées afin d'identifier des marqueurs génétiques prédictifs pour la toxicité au traitement. Au cours de ces études nous avons recherché également des facteurs génétiques associés à la réponse objective ainsi qu'avec la survie globale et la survie sans progression.

#### **II.1.1. Patients**

Pour chacune des études présentées au cours de cette thèse, 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 colorectal 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.

### II.1.1.1. Description des protocoles chimiothérapeutiques

Dans une première étude clinique, les 90 patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique ont été traités par le protocole de chimiothérapie FOLFIRI : Irinotécan 180mg/m<sup>2</sup> en perfusion I.V. sur 90 min + 5-FU 2500mg/m<sup>2</sup> en perfusion I.V. en continue sur 46h + acide L-folinique 400mg/m<sup>2</sup> en bolus I.V., sur un schéma toutes les deux semaines.

Dans la deuxième étude clinique, les 118 patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique ont été traités selon le protocole FOLFOX-4. L'oxaliplatine a été administré toutes les 2 semaines, avant le traitement avec 5-FU, pendant 2 heures. La dose initiale est 85mg/m<sup>2</sup>. Les perfusions de magnésium et de calcium, avant et après la perfusion de l'oxaliplatine, ont été systématiquement effectuées pour chaque traitement pour prévenir l'apparition de la neurotoxicité aiguë.

Le 5-FU a été administré pendant 46 heures, après le traitement avec 200mg/m<sup>2</sup> de leucovorine, en bolus intraveineux, et de 400mg/m<sup>2</sup> de pousse de 5-FU, par voie intraveineuse, pendant 10 minutes. Une adaptation de dose de 5-FU est réalisée à l'aide d'une surveillance pharmacocinétique, selon les concentrations plasmatiques de fluorouracile après 43 heures [Gamelin *et al.*, 1998]. En cas de patients présentant des mutations de la DPD - 2846A> T, IVS14 +1 G> A, 1679T> G, 464 T> A - la dose initiale a été réduite à 50% [Capitain *et al.*, 2007].

La bilirubine totale (facteur déterminant pour l'Irinotécan) était considérée normale si  $\leq 10$  mg/ml ou  $\leq 22$   $\mu$ mol/L. Les patients à risque cardio-vasculaire ont bénéficié d'une consultation de cardiologie autorisant la mise en route d'un traitement par fluorouracile.

### II.1.1.2. Evaluation des paramètres cliniques

#### a. Evaluation du *Performance Status*

L'état d'autonomie et de santé globale d'un patient sont évalués selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) :

- *Grade 0* : activité physique intacte ; efforts possibles sans limitation ;
- *Grade 1* : réduction des efforts ; autonomie complète ;
- *Grade 2* : personne encore autonome ; se fatigue facilement ; nécessité de se reposer plus de 6h/jour ;
- *Grade 3* : personne dépendante ; lever possible ; ne fait pas sa toilette seul ;
- *Grade 4* : dépendance totale ;

### **b. Evaluation des toxicités**

L'évaluation de la tolérance au traitement est réalisée par l'échelle de toxicité définie selon les critères OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Concernant la neurotoxicité propre à l'Oxaliplatine, la classification américaine NCI (National Cancer Institut) à été privilégiée. Tous les évènements indésirables ont été notés, notamment les toxicités hématologiques, les diarrhées, les mucites, les atteints oculaires et le syndrome « mains et pieds ».

Les toxicités de grades 1 et 2 sont généralement considérées comme acceptables, les toxicités de grade 3 et 4 ne sont pas acceptables dans le cadre d'un traitement anticancéreux et doivent faire l'objet d'une prise en charge thérapeutique.

### **c. Evaluation des réponses**

L'évaluation de la réponse, réalisée en général trois mois après le début du traitement, est également définie selon les critères OMS:

- *Réponse complète* : disparition de la totalité de la tumeur et des signes associés à la présence de la tumeur, sans apparition de nouvelle lésion, pendant un minimum de quatre semaines ;

- *Réponse partielle* : se manifeste par une régression du volume de toutes les masses tumorales d'au moins 50 % pendant au moins quatre semaines, sans qu'en soient apparues de nouvelles ;

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

- *Progression tumorale* : se traduit par une augmentation de plus de 25 % du volume des lésions ou l'apparition de nouvelles lésions. Elle témoigne d'une insensibilité complète du cancer au médicament et conduit à l'arrêt du traitement.

### **d. Définition de la survie sans progression (SSP)**

La survie sans progression correspond à la période séparant la date du début de traitement et la date de la progression tumorale. Elle est souvent utilisée à la place de la survie totale puisqu'elle est plus pertinente dans les études de courte durée.

### II.1.2. Sélection des SNPs

Nous avons sélectionné les polymorphismes a étudié parmi des gènes décrits dans différentes études supposés avoir un impact important dans l'apparition des toxicités ou des résistances aux chimiothérapies à base des trois molécules utilisées dans le traitement du cancer colorectal : 5-FU, Oxaliplatine et Irinotécan. Nous avons également inclus dans l'étude quelques polymorphismes pour lesquelles la fréquence de l'allèle mutée n'a pas été montrée précédemment. Le fait qu'il soit très probable que ces polymorphismes altèrent les fonctions des gènes justifie notre choix.

### II.1.3. Méthodes de génotypage

Pour chaque étude, les recherches des différents polymorphismes ont été effectuées sur de l'ADN génomique (ADNg) extrait à partir des cellules nucléées contenues dans le sang total. Le fragment d'ADNg d'intérêt a été ensuite amplifié par une réaction de PCR et le simple brin a été obtenu après dénaturation. L'analyse de cette séquence pour la détection de la mutation a été conduite par miniséquençage luminométrique en temps réel ou pyroséquençage, selon la technique de Ronaghi [Ronaghi *et al.*, 1996].

Afin d'optimiser les PCR, certaines paramètres ont été modifiés, comme la température d'hybridation ou l'addition d'adjuvants (comme la bétaine pour l'amplification des fragments d'AGXT et le DMSO, pour l'amplification du fragment d'intérêt de la TS).

#### II.1.3.1. Isolement des leucocytes l'ADN génomique

Le prélèvement de sang de patients a été réalisé dans des tubes héparinés. Afin d'isoler les leucocytes, 500µl du sang sont mélangés avec 1 ml de solution du lyse des globules rouges (*Red Blood Cell lysis buffer*, **Roche**). Après agitation rotative à 45 tours/ min pendant 10 min, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 1300g. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est repris dans 500µl de solution de conservation des acides nucléiques (*RNA/DNA Stabilisation Reagent for Blood/Bone Marrow*, **Roche**) et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.

#### II.1.3.2. Isolement de l'ADN génomique

Cette étape est réalisée par la plat-forme de génétique moléculaire INCa (*Institut national du cancer*) à l'aide du kit *DNA Isolation Kit for Blood/Bone marrow/Tissue*, Roche, selon les recommandations du fabricant.

La quantification de l'ADNg est réalisée par spectrophotométrie. La densité optique (D.O.) est mesurée à 260nm et la qualité du mélange est évaluée par le rapport 260nm /280 nm. L'ADNg est conservé à 4°C ou à -20°C en fonction du délai d'utilisation ultérieur.

### **II.1.3.3. Amplification par PCR des séquences d'ADNg contenant les mutations recherchées**

La réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été utilisée pour amplifier les séquences d'ADNg contenant les mutations recherchées. Les amorces utilisées pour les réactions d'amplifications par PCR ont été désignées à l'aide du logiciel *PSQ Assay Design* (**Biotage**).

Généralement, l'amplification est effectuée dans un mélange réactionnel de 50µl contenant 100ng d'ADNg, 0,5U de Taq DNA polymérase (**Promega**) dans un tampon Tris-HCl à pH 8,5 (**Promega**), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> et 200µM final de chaque nucléotide (dNTP) (**Invitrogen**). La concentration finale de chaque amorce est de 10pmoles.

La bétaine (1,3M) ou le DMSO (5 % V/V), sont parfois utilisés comme additifs, afin d'améliorer le rendement d'amplification pour certaines PCR. Un témoin négatif, avec tous les constituants sauf l'ADN, et un témoin positif d'amplification, consistant dans l'amplification d'un fragment de 230pb du G3PDH en présence de l'ADNg, sont réalisés pour chaque série d'amplification.

Le programme de PCR a comporté une première étape de 5 min permettant la dénaturation de l'ADNg et l'activation de la Taq polymérase, suivie de 30-35 cycles consistant en 30s de dénaturation de l'ADN à 94°C, d'hybridation des amorces (entre 50 et 60°C, selon la température de fusion des amorces), puis la polymérisation à 72°C et 10 min d'élongation finale à 72°C. Les séquences des amorces utilisées pour amplifier les différents fragments d'intérêt sont indiquées dans l'Annexe I.

Afin de réaliser le contrôle de l'amplification du fragment cible, 8µl de chaque produit de PCR est analysé sur gel d'agarose 1,2 % en présence de BET (0.5µg/ml).

### **II.1.3.4. Mini-séquençage luminométrique en temps réel**

#### ***Principe***

La technique de pyroséquençage permet de déterminer en temps réel l'enchaînement nucléotidique d'un fragment d'ADN simple brin de quelques dizaines de bases. Cette méthode consiste à quantifier indirectement le pyrophosphate produit lors de la formation

## CHAPITRE 2

d'une liaison phosphodiester lors de la synthèse du brin complémentaire [Ronaghi *et al.*, 2001].

A partir d'un ADN double brin, préalablement amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'amorce dont une est biotinyllé en 5', nous avons récupéré - après la dénaturation par la soude (NaOH) - le simple brin biotinyllé fixé sur des billes de streptavidine par affinité biotine/avidine. Une amorce de séquence, spécifique de la région à séquencer, est fixée sur cet ADN simple brin. Ce complexe, ADN/amorce de séquence, est alors incubé avec le milieu réactionnel comprenant les enzymes, les substrats et les nucléotides.

L'ADN polymérase à partir de l'amorce de séquence catalyse l'incorporation des nucléotides complémentaires de la séquence matrice, présents dans le milieu. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par le brin complémentaire, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse libérant de manière stœchiométrique un pyrophosphate. Grâce à une ATP Sulfurylase, ce pyrophosphate est transformé en ATP qui est utilisé par une luciférase pour oxyder la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction va émettre un signal lumineux qui est capté ensuite par une caméra CCD (*Charge Coupled Device*). Ce signal est reproduit sous la forme d'un pic sur un pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de liaisons phosphodiesters formées et donc au nombre de nucléotides incorporés (Figure II.1). Par additions séquentielles de quatre nucléotides nous pouvons donc déduire la séquence de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet de quantifier la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.



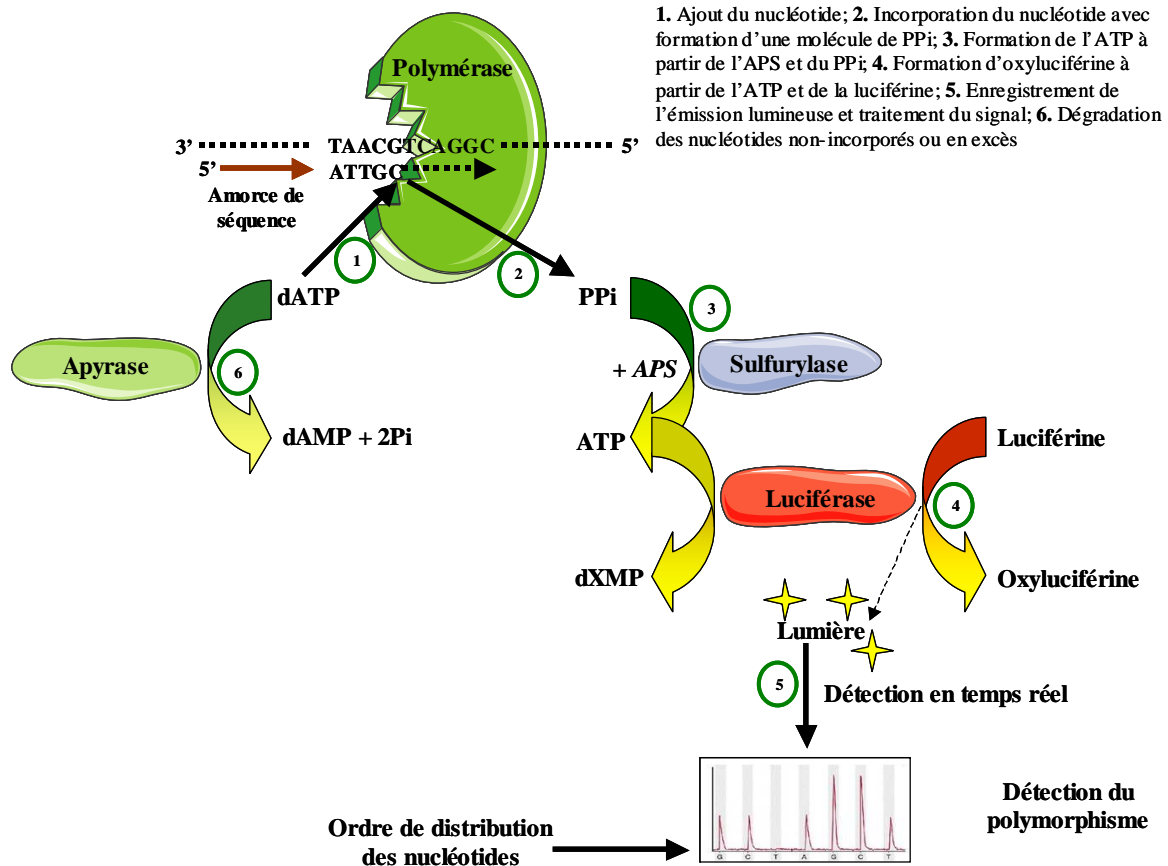


Fig. II.1. Principe du pyroséquençage

**Protocole expérimental**

Les amorces de séquence utilisées pour les réactions du pyroséquençage ont été dessinées à l'aide du logiciel *PSQ Assay Design* (**Biotage**). La réaction du pyroséquençage luminométrique en temps réel est décomposée en plusieurs étapes dont le déroulement est présenté par la suite :

**Préparation du simple brin**

Elle se déroule en plaque 96 puits. Une PCR de la séquence cible est préalablement réalisée. Celle-ci a la particularité d'être réalisé avec un couple d'amorces dont l'une porte une biotine à son extrémité 5'. Des billes de sépharose recouvertes de streptavidine (*Streptavidin Sepharose<sup>TM</sup> HP*, **Amersham Bioscience**) sont utilisées pour immobiliser l'ADN double brin biotinylé à un des extrémités et incubé pendant 5 min à température ambiante dans un mélange de 3µl de billes et 37µl de tampon de fixation (10mM Tris Base, 2M NaCl, 1mM EDTA, 0,1 % Tween 20, pH 7,6). 40µl d'ADN amplifiés sont déposés dans chaque puits, puis le mélange est agité durant 5 min à température ambiante. Après incubation, 15µl d'eau stérile sont ajoutés dans les puits. Les doubles brins liés aux billes de

## CHAPITRE 2

streptavidine sépharose sont isolés du milieu réactionnel par aspiration sur des filtres retenant les billes.

### **Dénaturation du double brin**

L'ADN immobilisé sur les filtres est plongé dans une solution de dénaturation alcaline (0,2N NaOH) générant des simples brins. Le brin biotinyllé reste fixé aux billes grâce à la liaison biotine/streptavidine et donc retenu par le filtre. Le brin complémentaire non biotinyllé est éliminé par aspiration. Ensuite, le filtre est lavé par une solution Tris 10mM, pH 7,6 afin d'éliminer les restes de sonde d'ADN non biotinyllé et de neutraliser la suspension.

### **Hybridation de l'amorce de séquence**

Dans une plaque 96 puits, 1,5µl (10mM) d'amorce de séquence sont déposés dans chaque puits. Elle est mise en présence de 50µl de tampon d'hybridation (20mM Tris Base, 2mM Mg(COO<sup>-</sup>)<sub>2</sub>, pH 7,6). Les billes de sépharose sont plongées dans les puits mettant ainsi en contact l'ADN biotinyllé simple brin à séquencer et l'amorce de séquence. La plaque est incubée 2 min à 80°C. L'hybridation de l'amorce est effectuée par retour à température ambiante. Les séquences des amorces utilisées pour amplifier les fragments d'intérêt sont présentées dans l'Annexe I.

Deux témoins négatifs sont toujours réalisés. L'un contient seulement le produit PCR sans l'amorce de séquence. Le second ne contient que l'amorce de séquençage.

L'ordre de distribution des nucléotides est déterminé pour chaque type de mutation recherchée et dépend de la séquence à analyser. La visualisation des pics est effectuée en temps réel.

### **Mini-séquençage en temps réel**

Le kit utilisé pour la réaction de mini-séquençage est le *PyroMark Gold Q96 Reagents* (Qiagen, Hilden, Allemagne).

Le mélange contenant les enzymes (ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase, apyrase), celui contenant les substrats (adénosine 5' phosphosulphate ou APS, luciférine), ainsi que les quatre désoxynucléotides triphosphate (dNTP), sont introduits dans une cartouche adapté à l'appareil PSQ<sup>TM</sup>96 MA (**Pyrosequencing AB**, Uppsala, Sweeden).

Le calcul du volume de chaque solution à introduire dans la cartouche pour l'analyse est réalisé automatiquement à l'aide du logiciel PSQ 96MA, la version 2.1.

### **II.1.4. Méthodes statistiques utilisées**

Les analyses statistiques des deux études cliniques rétrospectives menées au cours de cette thèse ont été réalisées à l'aide du service de statistique du Centre Paul Papin d'Angers. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS® (Chicago, USA). L'étude comparative des différentes populations, classées en fonction de leurs polymorphismes génétiques, est réalisée en utilisant le test de  $\chi^2$  et le test de Fisher. Ces tests ont été utilisés 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 afin d'éviter les biais sur les taux de réponses, de survies et de toxicités corrélées aux polymorphismes étudiés (nombre de sites métastatiques (1 vs plusieurs), *performance status* (0 ou 1 vs 2), âge (< 60, 60-70 vs > 70) et sexe. Tout d'abord chaque génotype a été étudié individuellement et une analyse multivariée a été mise en place si plusieurs génotypes ont montré une corrélation significative. La régression logistique est utilisée pour déterminer le risque de toxicités en analyse univariée et multivariée. Le risque d'erreur  $\alpha$  a été classiquement fixé à 5 %. L'association entre chaque polymorphisme et la survie sans progression ainsi que la survie globale a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier. La comparaison des courbes de survie a été réalisée par le test de log rank. Le modèle de Cox a été également utilisé pour étudier la survie en analyse univariée et multivariée. Le risque relatif ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) ont été aussi calculés.

### **II.2. ERCC1 et son rôle dans la résistance à l'Oxaliplatine**

L'échappement des tumeurs à la chimiothérapie, par le développement de divers mécanismes de résistance est un problème majeur en cancérologie. Concernant l'Oxaliplatine, les mécanismes étant à l'origine des résistances au traitement sont encore mal connus, mais une implication des gènes de réparation de l'ADN semble être liée à l'efficacité de ce médicament.

La caractérisation des profils individuels de réparation de l'ADN est de plus nécessaire pour améliorer les stratégies de chimiothérapie.

Des nombreux travaux de recherche ont montré que les variants, dans n'importe quel gène du NER (*Nucleotide Excision Repair*), peuvent moduler et contribuer à la variation individuelle de la réponse à la chimiothérapie à base d'Oxaliplatine.

Il a été remarqué qu'ERCC1, une enzyme appartenant au système de réparation par excision des nucléotides (NER), joue un rôle essentiel dans le processus de réparation de l'ADN [Reed *et al.*, 1998 ; Raymond *et al.*, 2002] et que l'expression de cette protéine semble liée à la résistance clinique [Lee *et al.*, 1993]. Par ailleurs, il a été montré que les mutations de Ras peuvent être responsables d'une augmentation de l'expression d'ERCC1 [Youn *et al.*, 2004] et donc d'une résistance au traitement à base de l'Oxaliplatine.

Dans un premier temps nous avons investigué *in vitro* le rôle d'ERCC1 comme possible marqueur génétique de résistance à l'Oxaliplatine, dans un contexte de présence ou absence des mutations de l'oncogène K-Ras. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'impact de la surexpression ou de l'inhibition de l'expression d'ERCC1, sur deux lignées cellulaires issues d'un carcinome de colon (différentes du point de vue mutationnel pour K-Ras) en présence d'Oxaliplatine.

### **II.2.1. Etude de cytotoxicité à l'Oxaliplatine**

Dans le but de mieux caractériser ERCC1 et de préciser son rôle dans les phénomènes de résistance à l'Oxaliplatine, nous avons regardé dans un premier temps, la cytotoxicité de cette molécule sur les deux lignées cellulaires que nous avons choisies comme modèles d'étude. Les deux lignées cellulaires utilisées dans notre étude sont différentes sur le statut mutationnel de l'oncogène K-Ras. Le pourcentage de survie cellulaire, ainsi que la concentration de l'Oxaliplatine inhibant 50 % de la croissance cellulaire (IC<sub>50</sub>) des cellules HT29 (K-Ras sauvage) et HCT116 (K-Ras muté), ont été déterminés par la technique au sulforhodamine B (SRB).

#### **II.2.1.1. Lignées cellulaires**

Les HT29 et HCT116 proviennent de l'ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA). Elles sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté par 10 % de SVF (sérum de veau fœtal). Les cellules sont cultivées en incubateur à 37°, sous 5 % de CO<sub>2</sub>, en atmosphère humide. Les milieux de culture proviennent de la société Lonza (**Carlsbad**, Belgique) à l'exception de l'Oxaliplatine (**Sigma-Aldrich**, St Louis, USA).

#### **II.2.1.2. Test de la croissance cellulaire au SRB (Sulforhodamine B)**

Les cellules ont étéensemencées en J1 dans des plaques 96 puits. Chaque plaque a été organisée pour contenir une colonne avec des cellules sans traitement et neuf colonnes

## CHAPITRE 2

contenant des cellules traitées avec des concentrations croissantes du médicament. La densité des cellules est de 2200 cellules/puits pour les HT29 et 1500 cellules/puits pour les HCT116, dans un volume final de 50µl/puits. Au début du traitement, une première plaque (servant de témoin) T0 est fixée avec 60µl acide trichloracétique 50 % pendant 60 min à 4°C, ensuite lavée 5 fois à l'eau et séchée à la T<sub>ambiante</sub>.

Après adhésion, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de l'Oxaliplatine (intervalle de concentrations : 0,04µM-100µM), pendant 48h, dans un volume final de 75µl. Après l'exposition au médicament, le milieu a été remplacé avec 50µl milieu RPMI 1640 10 %SVF et les cellules ont été cultivées pendant 72h.

Les cellules ont été après précipitées avec 60µl acide trichloracétique 50 % pendant 60 min à 4°C, lavées 5 fois à l'eau et séchées à la T<sub>ambiante</sub>. La Sulforhodamine B (0,4%, acide acétique 1%) a été solubilisée avec 100µl de solution Tris base 10mM, pH 10,5.

Les densités optiques (D.O.) ont été mesurées à 564nm. Les courbes de croissance-inhibition ont été réalisées et exprimées en pourcentage par rapport aux cellules contrôle. Les résultats sont obtenus sur quatre essais différents.

$$\% \text{ croissance cellulaire} = (T_{\text{médicament}} - T_0) / (T_{\text{contrôle}} - T_0) * 100$$

### II.2.2. Modulation de l'expression d'ERCC1 par l'Oxaliplatine

ERCC1 semble être un facteur-clé dans la réparation des lésions créées par l'Oxaliplatine participant ainsi à la modification de la cytotoxicité du médicament.

Une modulation de l'expression d'ERCC1 suite a un traitement par l'Oxaliplatine pourrait offrir un possible explication pour la variation de la réponse cellulaire à cette molécule. Nous nous sommes donc proposés d'évaluer l'influence de l'Oxaliplatine sur l'induction d'ARNm d'ERCC1, ainsi que sur la variation de l'expression de la protéine au cours du temps, dans les cellules HCT116 et HT29. Nous nous sommes également intéressés à la localisation de la protéine ERCC1 dans les deux lignées cellulaires, après traitement à l'Oxaliplatine. L'hypothèse étant que la localisation d'ERCC1 dans les cellules tumorales pourra être corrélée avec leur capacité de réparation des lésions de l'ADN, et donc avec leur capacité de réponse au traitement.

#### II.2.2.1. Évaluation de l'expression d'ARNm d'ERCC1 par RT-PCR

Les cellules sont cultivées en boîte 60mm<sup>2</sup> et traitées avec 10µM de l'Oxaliplatine pendant différentes périodes de temps (1h, 2h, 24, et 48h). L'extraction d'ARN totaux est

réalisée au trizol, puis quantifiés par lecture de DO à 260nm. La réaction de rétrotranscription et la PCR, sont réalisées selon les protocoles indiqués par la suite.

### ***II.2.2.1.1. Extraction d'ARNm et la Transcription inverse***

Pour la réalisation de la rétrotranscription nous avons utilisé 2µg d'ARN totaux auxquels nous avons ajouté 1µl d'amorces hexamériques aléatoires (Amersham Pharmacia Biotech), dans un volume final de 15µl. L'ensemble est incubé 5 min à 70°C, puis placé dans la glace. Ensuite, 35µl de mélange contenant du tampon MMLV 1X (*MMLV Buffer 5X*, **Promega** corporation, Madison, USA), 400nM dNTP, 25U de *Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor* (**Promega**) et 200 U de MMLV Reverse Transcriptase (**Promega**) sont ajoutés à la réaction dans un volume final de 50µl puis incubé pendant 1 heure à 37°C. Les ADNc obtenus sont stockés à -20.

### ***II.2.2.1.2. PCR quantitative en temps réel***

La réaction du PCR est réalisée dans un volume final de 10µl, comprenant 5µl d'ADNc dilués au 20ème, 5 µM de chaque amorce (**MWG Biotech**, Ebersberg, Allemagne), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> et le tampon à 1X final, contenant le SYBR green, les dNTPs et une HotStart Taq polymérase (*Quantitect SYBR Green PCR*) (**Qiagen**). Un témoin négatif est réalisé pour chaque couple d'amorce.

Le programme de PCR comporte 3 étapes : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie par un programme d'amplification de 40 cycles (15 s à 95°C, 11 s à 55°C, 22 s à 72°C), avec une lecture unique de la fluorescence de SYBR green en fin de chaque élongation terminée par un programme de courbe de fusion (dénaturation à 95°C, renaturation des brins d'ADN par abaissement de la température à 65°C pendant 30 s, puis dénaturation lente par élévation de la température de 65°C à 95°C à 0,1°C/s, avec une lecture de la fluorescence en continu) (Figure II.2).

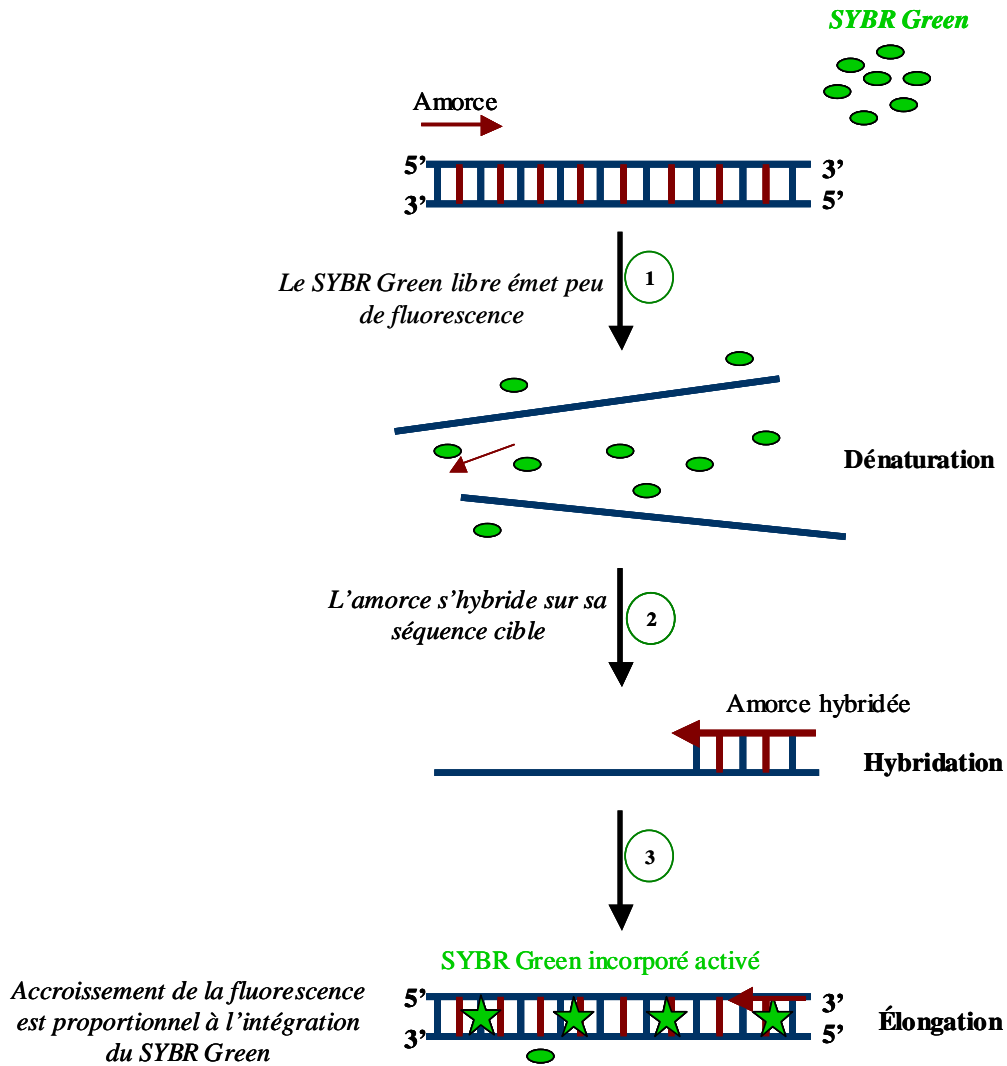


Fig. II.2. Principe de l'amplification par PCR en temps réel

Les résultats sont analysés par la méthode *Fit Point* à l'aide du logiciel LightCycler, version 3.5.3. La courbe de fusion, à la fin du programme, permet de vérifier la spécificité de chaque amplification. Une dilution appropriée de chaque ARN total utilisé lors de la rétrotranscription, subit également une amplification par PCR, afin de vérifier l'absence d'ADNg dans les ARN totaux.

La quantification relative de l'expression génique est réalisée par la méthode de comparaison des cycles «seuil» ( $C_t$  - pour *cycle threshod* [Fink *et al.*, 1998]). Le niveau d'expression des gènes est normalisé avec le gène de ménage endogène G3PDH et le facteur d'amplification est calculé selon la formule suivante, en considérant que l'efficacité de PCR est proche de 100 % [Favy *et al.*, 2000].

$$IF = 2^{-\Delta\Delta CT} \text{ où } \Delta\Delta CT = [C_{T(\text{gène})} - C_{T(G3PDH)}]_{\text{médicament}} - [C_{T(\text{gène})} - C_{T(G3PDH)}]_{\text{contrôle}}$$

IF – facteur d'induction

## CHAPITRE 2

Le facteur d'amplification est calculé d'après une moyenne de trois répétitions de l'expérience.

### II.2.2.2. Évaluation de l'expression de la protéine ERCC1 par Western Blot

Les cellules sont cultivées dans des boîtes 100 mm<sup>2</sup> et stimulées avec de 10µM Oxaliplatine pendant différents intervalles du temps, entre 2h et 72h. Après le traitement, les cellules sont lavées avec du PBS 1X, puis lysées dans 200µl de tampon [1 % SDS ; 50mM Tris (pH 7,5) 10mM EDTA]. Ce lysat cellulaire est récupéré puis transféré dans un tube Eppendorf et incubé pendant 30 min à 4°C. Une sonication pendant 10sec est ensuite réalisé, puis le tout est centrifugé 10 min à 12 000 rpm à une température de 4°C. Le surnageant est enfin récupéré et conservé à -80°C.

#### Dosage des protéines

La concentration en protéines de chacun des lysats cellulaires est évaluée par le système BCA (*BC Assay : Protein Quantification Kit*) (**Uptima**, Interchim, Montluçon, France.) selon le protocole du fabricant.

#### Transfert Western

Une quantité de 50µg de protéine (dénaturées 5 min à 100°C) est utilisée pour chacune des conditions à l'étude. La migration est effectuée à 120V pendant deux heures, dans un tampon [250mM Tris-base (pH 8,3), 1,92M glycine, 34,7mM SDS, H<sub>2</sub>O]. Le transfert des protéines se réalise par transfert demi-sec (Trans-blot® SD, Bio-rad, Hercules, USA) sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène) (**Millipore Corporation**, USA), qui a été préalablement immergée dans du méthanol. La période de transfert est de 40 min à 20V en présence de tampon de transfert [250mM Tris base, 1,92M glycine, 20 % méthanol, H<sub>2</sub>O]. Par la suite, les sites non spécifiques sont bloqués en incubant les membranes avec une solution de blocage [3 % BSA, TBS - 0.05 % Tween20] pendant 1h à la température ambiante. Puis, les membranes sont incubées O/N à 4°C en présence de 200ng/ml anticorps primaires préalablement dilués dans du Tampon Ac [200mM NaCl, 50mM Tris (pH 7,6), 1 % BSA, 0,05 % Tween, H<sub>2</sub>O]. Après rinçage, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (40 ng/ml), couplé à la peroxydase, pendant 45 min à température ambiante. Finalement, après 3 lavages, les protéines sont visualisées par ajout d'un réactif de détection (**Amersham** Pharmacie Biotech, Piscataway, USA). La visualisation des protéines marquées se fait par électrochimiluminescente (ECL) à l'aide du ChemiDoc XRS (**Bio-rad**).



### II.2.2.3. Analyse de l'expression d'ERCC1 par FACS

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture 60 mm<sup>2</sup> et stimulées avec de 10µM Oxaliplatine pendant 48h. Ensuite, les cellules ont été récupérées, lavées dans du PBS et fixées pendant 10 min à 4°C dans 4 % p-formaldéhyde. Les cellules sont ultérieurement rincées au PBS et incubées 30 min à 4°C, dans une solution de perméabilisation [PBS supplémentée avec 1% BSA-Triton]. L'anticorps primaire (*anti-ERCC1 monoclonal antibody*, **Santa Cruz Biotechnology**, Santa Cruz, USA) dilué à 5 ng/µl dans la solution de perméabilisation est ajouté aux cellules pendant 2h à 4°C. Après lavages successives, l'anticorps secondaire couplé au FITC (**Santa Cruz Biotechnology**) dilué à 4 ng/µl dans la solution de perméabilisation, est incubé avec les cellules pendant 45 min, à 4°C. Une dernière série de lavage est ensuite réalisée puis les cellules sont analysées par FACS. L'acquisition des données et leurs analyses ont ensuite été effectuées par le logiciel CellQuest®.

### II.2.2.4. Etude de la localisation cellulaire d'ERCC1

Afin de déterminer la localisation cellulaire d'ERCC1 nous avons utilisé deux méthodes d'étude : la cytoimmunofluorescence et le Western blot, après fractionnement cellulaire cytoplasme/noyau, à différents temps du traitement.

#### II.2.2.4.1. Etude de la localisation de la protéine ERCC1 par Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles carrées de 15 mm de côté, la veille de la stimulation. Elles sont traitées pendant 48 h avec de l'Oxaliplatine, puis fixées pendant 30 min avec 2 % formaldéhyde. Les cellules sont ultérieurement rincées deux fois par du PBS, incubées 30 min avec de l'éthanol à 70 % et ensuite placées en solution de saturation (PBS supplémentée par 1 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*) pendant 15 min, à température ambiante. L'anticorps primaire (*anti-ERCC1 monoclonal antibody*, **Santa Cruz Biotechnology**, Santa Cruz, USA) dilué à 5 ng/µl dans la solution de saturation est ajouté aux cellules pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages, l'anticorps secondaire couplé au FITC (Isothiocyanat fluorescein) (**Santa Cruz Biotechnology**), dilué à 4 ng/µl dans la solution de saturation, est incubée avec les cellules pendant 30 min. Après un traitement des cellules à la RNase (20 min à 37°C), l'ADN des cellules est coloré par une solution de 0,7mM DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), un agent intercalant de l'ADN, pendant 5 min. Ensuite, les lamelles sont placées sur des lames dans un mélange PBS / 50 % glycérol / 0,1 % p-phénylènediamine.

Les cellules sont finalement observées au microscope à fluorescence Eclipse 80I (Nikon). L'archivage des images et l'analyse des données sont effectués à l'aide du logiciel Genikon® de Alphelys (Plaisir, France).

### **II.2.2.4.2. Etude de la localisation de la protéine ERCC1 par Western Blot**

Afin d'isoler la protéine ERCC1 des cultures cellulaires, les cellules sont cultivées dans des boîtes 100 mm<sup>2</sup>, stimulées avec 10µM Oxaliplatine pendant 48h et ensuite lysées dans 150µl de tampon A [10mM Hepes (pH 7,9) ; 10mM KCl ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>]. Le lysat est récupéré dans un tube, incubé durant 15 min dans la glace, puis soumis à 3 cycles congélation-décongélation (bain d'azote pendant 30s et bain à 37 °C pendant 5 min). Les noyaux cellulaires sont culottés par centrifugation à 2000 rpm, pendant 5 min. Le surnageant, correspondant à la fraction cytoplasmique, est récupéré et conservé à -80°C. Les noyaux sont rincés avec 1 ml de tampon A, reculottés par centrifugation à 2000 rpm (4°C, 5 min), puis lysés après ajout de 150µl de tampon B [25mM Hepes ; 300mM KCl ; 0,2 mM EDTA, 10 % glycérol] et incubation durant 30 min dans la glace. La fraction nucléaire est alors soniquée pendant 10 s, afin de segmenter l'ADN, puis centrifugée à 12000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -80°C.

Le dosage des protéines ainsi que le transfert sur la membrane sont réalisés selon le protocole présenté précédemment.

### **II.2.3. Impact de l'inhibition ou de la surexpression d'ERCC1 sur la survie cellulaire en présence de l'Oxaliplatine**

L'Oxaliplatine, comme les autres sels de platine, agit en formant des liaisons covalentes avec l'ADN, responsables de ponts inter- et intra-brin. Il inhibe donc la synthèse et la réplication de l'ADN. Comme nous l'avons déjà indiqué dans le premier chapitre de la thèse, les gènes du système de réparation des dommages de l'ADN par excision des nucléotides (NER ou *Nucleotide Excision Repair*), et en particulier la famille des gènes ERCC (*Excision Repair Cross-Complementary*), jouent un rôle important dans la réparation des lésions de l'ADN, induites par les sels de platine. Dans la plupart des études cliniques, pour un cancer colorectal métastatique, une corrélation inverse entre l'activité des gènes ERCC et le taux de réponse aux sels de platine a été rapportée [Shirota *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2001 ; Arnould *et al.*, 2003].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier l'implication d'ERCC1 dans la modulation de la réponse cellulaire et la survie à l'Oxaliplatine.

### Principe

L'étude de la survie cellulaire permet d'évaluer la réponse cellulaire et donc l'efficacité du traitement. L'impact de l'inhibition ou d'augmentation de l'expression d'ERCC1 sur la réponse cellulaire à l'Oxaliplatine est évalué par le test de survie cellulaire à la sulforhodamine B (SRB) dans des cellules transfectées.

#### II.2.3.1.1. Construction d'un vecteur d'expression d'ERCC1

La première étape dans la construction du vecteur d'expression d'ERCC1 a été d'isoler la séquence d'ADNc d'ERCC1 à partir du vecteur pcMV SPORT 6 puis d'insérer l'ADNc d'ERCC1 dans le vecteur pcDNA 4 (Figure II.3).

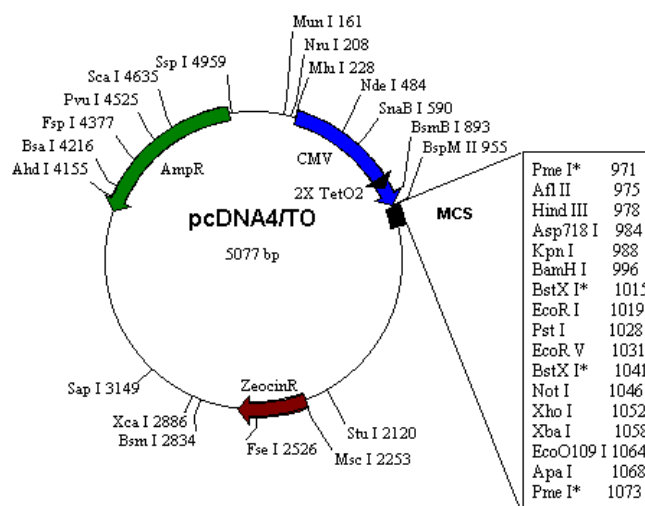


Fig. II.3. Vecteur utilisé pour le clonage de l'ADNc d'ERCC1

L'ADN plasmidique (pcMV SPORT6ERCC1) purifié (*QIAquick Purification minielute*, Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) est vérifié par une double digestion enzymatique. Pour cela, 1µg d'ADN plasmidique purifié est placé dans 50µl du mélange réactionnel comportant le tampon de digestion spécifique à l'enzyme, à une concentration finale de 1X (*buffer 10X*, New England Biolabs, Beverly, USA), 1X de BSA, 10U d'enzymes de restrictions EcoRI et NotI. La réaction est ensuite incubée à 37°C pendant une heure.

Les fragments obtenus après digestion ont été analysés sur gel d'agarose 1,2%. Après la migration, les fragments d'ADN ont été isolés à partir de gel d'agarose (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen).

## CHAPITRE 2

Le fragment d'ADN est d'abord excisé de l'agarose, pesé et resuspendu dans un volume de 300µl de tampon de dissolution par 100mg d'agarose prélevé. L'agarose est fusionnée à 50°C pendant 10 min, puis 100µl d'isopropanol sont ajoutés par 100mg d'agarose. La solution est ensuite appliquée sur une colonne et centrifugée à 13 000rpm pendant 1 minute. L'éluat est retiré, 750µl de tampon de lavage sont appliqués sur la colonne et la colonne est centrifugée à 13 000rpm pendant 1 minute. L'éluat est à nouveau retiré et la colonne est centrifugée à 13 000rpm 1 minute pour une deuxième fois. La colonne est déposée dans un nouveau tube et 20µl d'eau ont été appliqués pour éluer l'ADN contenant l'ADNc d'ERCC1.

La ligation est réalisée dans un volume de réaction final de 10µl contenant le tampon de ligation (*buffer 10X*) et 3U de T4 DNA ligase (**Promega**), 30 ng de vecteur pcDNA 4 et 4,5µl de l'insert ERCC1. La solution est placée à 4°C sur la nuit. Le produit de ligation est transformé dans des bactéries compétentes (*JM109*, **Promega**) puis, le plasmide est purifié en réalisant une maxipréparation (*QIAfilter plasmid maxi kit*, **Qiagen**).

### ***II.2.3.1.2. Surexpression ou inhibition d'ERCC1***

Les cellules HT29 et HCT116 sont ensemencées la veille de l'expérience, en boîte 60 mm<sup>2</sup>. Le lendemain les cellules sont transfectées avec du siRNA dirigé contre ERCC1 (**Santa Cruz Biotechnology**) ou du siRNA contrôle selon les recommandations du fournisseur. Vingt quatre heures après la transfection les cellules ont été comptées et ensemencées en plaque 96 puits. 24 h plus tard les cellules sont traitées avec de l'Oxaliplatine.

Les deux lignées cellulaires sont également transfectées de manière transitoire en présence de Lipofectamine 2000 (**Invitrogen**), selon les recommandations du fournisseur, avec un pcDNA4, contenant ou non la séquence d'ERCC1. Vingt-quatre heures après la transfection les cellules sont traitées par l'Oxaliplatine.

### ***II.2.3.1.3. Test de la croissance cellulaire au SRB (Sulforhodamine B)***

Le pourcentage de survie cellulaire, ainsi que la concentration d'Oxaliplatine inhibant 50 % de la croissance cellulaire (IC<sub>50</sub>) des cellules HT29 et HCT116, après la surexpression ou l'inhibition d'ERCC1, ont été déterminés par la technique au sulforodamine B (SRB), selon le protocole décrit auparavant.

Comme indiqué précédemment, les cellules ont été cultivées en J1 dans des plaques 96 puits. Chaque plaque contient une colonne sans traitement et neuf colonnes avec des concentrations croissantes du médicament. La densité des cellules est de 2200 cellules/puits pour les HT29 et 1500 cellules/puits pour les HCT116 (dans le but que ces deux lignées

cellulaires soient à 50% de confluence au moment du traitement) dans un volume final de 50µl/puits. Au début du traitement, une première plaque (servant de témoin) T0 est fixée à l'acide acétique.

Après leur adhérence, les cellules ont été transfectées comme indiqué précédemment. Vingt quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de l'Oxaliplatine (intervalle de concentrations : 0,04µM-100µM), pendant 48h, dans un volume final de 75µl. Après l'exposition au médicament, le milieu a été remplacé avec 50µl milieu RPMI 1640 10 %SVF et les cellules sont incubées pendant 24h. Par la suite, le traitement des plaques a été réalisé selon le protocole présenté précédemment.

### **II.2.4. Impact de l'inhibition ou de la surexpression d'ERCC1 sur l'expression d'ARNm des certains gènes pouvant être à l'origine des résistances**

Un deuxième objectif de cette partie a été d'évaluer le rôle d'ERCC1 dans la modulation de l'expression d'ARNm de ses partenaires directs, XPA et XPF, gènes qui eux peuvent aussi avoir un impact sur la réponse à l'Oxaliplatine.

Pour cela, les cellules HT29 et HCT116, après une transfection, soit par un siRNA pour inhiber l'expression d'ERCC1, soit par un pcDNA4-ERCC1 pour surexprimer cette protéine, ont été soumises pendant 48 h à un traitement avec de l'Oxaliplatine (10µM).

L'étude de la variation de l'expression des ARNm des différents gènes d'intérêt a été réalisée à l'aide de thermocycleur LightCycler® (**Roche Diagnostics GmbH**, Mannheim, Allemagne).

#### ***II.2.4.1.1. Inhibition d'ERCC1***

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en boîte 60 mm<sup>2</sup>.

Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre ERCC1 ou un siRNA contrôle, suivant les consignes du fabricant (**Santa Cruz Biotechnology**). Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont traitées avec 10 µM de l'Oxaliplatine durant 48h. L'étude de la variation de l'expression de la protéine est réalisée par Western blot.

#### ***II.2.4.1.2. Surexpression d'ERCC1***

Les cellules HT29 et HCT116 sontensemencées la veille de l'expérience en boîte 60 mm<sup>2</sup>. Le lendemain, les cellules sont transfectées de manière transitoire en présence de Lipofectamine 2000 (**Invitrogen**), selon les recommandations du fournisseur, avec un pcDNA4 avec ou sans ERCC1. Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont

stimulées avec 10 $\mu$ M de l'Oxaliplatine pendant 48h, puis elles sont lysées. L'expression d'ERCC1 est détectée par Western blot.

### ***II.2.4.1.3. Extraction d'ARNm et la Transcription inverse***

Les cellules sont cultivées en boîte 60 mm<sup>2</sup> et traitées avec 10 $\mu$ M de l'Oxaliplatine pendant 48h. L'extraction d'ARN totaux est réalisée au trizol, puis quantifiés par l'absorbance à 260nm. La réaction de rétrotranscription, ainsi que celle de PCR, sont réalisées selon les protocoles indiqués auparavant. Les séquences des amorces utilisées pour les réactions du qPCR sont indiquées dans l'Annexe II.

## ***II.3. Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux***

Les mutations activatrices de K-Ras président les phénomènes de résistances aux traitements avec anticorps anti-EGFR. La présence ou l'absence de mutation du gène K-Ras est donc devenu un critère important pour le choix d'une thérapie adéquate et il est maintenant établi que seuls les patients ayant une tumeur avec un gène K-Ras de type non-muté peuvent bénéficier d'un traitement anti-EGFR. Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour la recherche des mutations de K-Ras, mais la grande difficulté rencontrée est l'absence d'une méthode standardisée et d'un contrôle de qualité pour chaque technique utilisée.

Au cours de cette partie de la thèse nous présenterons la technique de pyroséquençage, comme technique fiable et reproductible pour la recherche des mutations de K-Ras dans les cellules tumorales. Pour cela, deux aspects sont développés. Tout d'abord, il s'agit de l'analyse *in vitro*, sur des mélanges des cellules K-Ras non-muté et K-Ras muté, du seuil de détection des mutations de cet oncogène par pyroséquençage. Ensuite, un deuxième aspect envisage un contrôle qualité de cette technique réalisé suite à la participation de la plate-forme de génétique moléculaire INCa de notre laboratoire à un projet national dans le cadre d'un STIC (*Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses*).

### **II.3.1. Détermination *in vitro* du seuil de détection des mutations de K-Ras par pyroséquençage**

Afin de déterminer *in vitro* le seuil minimum de détection des mutations de l'oncogène K-Ras par pyroséquençage, nous avons réalisé des mélanges des cellules avec un gène K-Ras

de type non-muté (HT29) et des cellules avec un gène K-Ras de type muté : soit G12D (LS174T), soit G13D (HCT116).

Après l'extraction d'ADN, les séquences contenant les mutations ont été amplifiées par des réactions de PCR. Afin de détecter les mutations recherchées (notamment G12D et G13D) l'analyse des séquences amplifiées a été réalisée par miniséquençage luminométrique en temps réel. Des témoins négatifs et positifs ont été également réalisés.

Notons également que le statut mutationnel de K-Ras des trois lignées utilisées dans l'étude a été préalablement déterminé par pyroséquençage, suite à la comparaison des pyrogrammes obtenues avec les histogrammes théoriques.

### II.3.1.1. Dilutions réalisées

Afin d'identifier le seuil minimum de détection de la mutations GGT→GAT (exon 1, codon 12) et de la mutation GGC→GAC (exon 1, codon 13) du K-Ras nous avons réalisé, dans six tubes différentes, des dilutions des cellules avec le gène K-Ras mutés (LS174T ou HCT116) dans des cellules avec le gène K-Ras de type non-muté (HT29). Le nombre final de cellules dans chaque tube est de  $10^6$  cellules. Les tubes ont été préparés de manière suivante :

	<b>Nombre cellules LS174T ou HCT116 dans HT29</b>
<b>Tube 1</b>	$10^6$
<b>Tube 2</b>	$10^1$
<b>Tube 3</b>	$10^2$
<b>Tube 4</b>	$10^3$
<b>Tube 5</b>	$10^4$
<b>Tube 6</b>	$10^5$

**Tab. II.1. Dilutions réalisées afin de déterminer le seuil minimum de détection pour les mutations G12D et G13D**

Une fois les mélanges réalisés, l'ADNg a été extrait à l'aide de l'automate Maxwell (**Promega**), selon les indications du fournisseur. Ensuite, chaque ADNg a été dosé par spectrophotométrie à 260nm.

### II.3.1.2. Analyse des échantillons par pyroséquençage

L'amplification d'un fragment de 180pb de K-Ras, contenant les mutations G12D et G13D, est effectuée dans un mélange réactionnel de 50µl contenant environ 100ng d'ADNg, 0,5U de Taq DNA polymérase (**Promega**) dans un tampon 1X à pH 8,5 (**Promega**), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> et 200µM final de chaque nucléotide (dNTP). La concentration finale de chaque amorce est de 10pmoles. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans l'Annexe I.

L'analyse des ADN mutés (notamment G12D et G13D) réalisée au pyroséquenceur est effectuée avec une dispensation spécifique de la mutation. L'amorce de séquence utilisée est à une concentration finale de 10pmoles. De plus, une détermination du pourcentage d'allèles mutés a été réalisée pour chaque échantillon analysé.

### II.3.2. Etude STIC Phase I

Afin de réaliser un contrôle qualité de la technique du pyroséquençage, nous avons participé à un projet national dans le cadre d'un STIC (*Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses*), projet qui a eu pour but de mettre en place de « norme qualité » autour du test K-Ras, de mettre en commun des contrôles standardisés et de valider les technologies les unes par rapport aux autres.

Dans le cadre de l'essai STIC 96 échantillons d'ADNg mutés ou non sur le gène K-Ras ont été analysés. L'analyse des échantillons a été réalisée par la plat-forme de génétique moléculaire INCa (*Institut national du cancer*) d'Angers, selon le protocole décrit par la suite.

#### II.3.2.1. Détection des mutations du K-Ras par pyroséquençage

La première étape a prévu l'amplification d'un fragment de 180pb de K-Ras, contenant les mutations aux codons 12 et 13. Cette amplification est effectuée dans un mélange réactionnel de 50µl contenant environ 100ng d'ADNg, 0,5U de Taq DNA polymérase (**Promega**) dans un tampon 1X à pH 8,5 (**Promega**), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> et 200µM final de chaque nucléotide (dNTP). La concentration finale de chaque amorce est de 10pmoles.

Pour chaque échantillon une double amplification du fragment d'ADN contenant les codons 12 et 13 est réalisée. La première amplification servira à identifier la présence des mutations G12D, G12V et G12R. La deuxième amplification sert à confirmer la présence des mutations G12S, G12C, G12A et G13D. Une détermination du pourcentage d'allèles mutés peut également être réalisée. Dans le cas d'identification des ADN mutés, l'ADN en cause est repassé au pyroséquençage avec une dispensation spécifique de la mutation à vérifier. L'amorce de séquence utilisée est à une concentration finale de 10pmoles.

Des témoins négatifs sont réalisés comme indiqué auparavant pour toutes les étapes de l'analyse.



### **III. Résultats**

#### ***III.1. Identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l'Irinotécan et à l'Oxaliplatine***

L'association des plusieurs molécules dans un protocole chimiothérapeutique représente le pilier du traitement du cancer colorectal métastatique. Elle peut être responsable d'une augmentation du taux de réponse, ainsi que d'une augmentation de la survie des patients. Les protocoles qui utilisent l'association entre l'acide L-folinique, le 5-FU et l'Irinotécan (FOLFIRI) ou l'Oxaliplatine (FOLFOX) sont devenu les protocoles les plus souvent utilisés, en première ligne chimiothérapeutique, pour traiter les cancers colorectaux. En même temps, les polymorphismes génétiques au niveau des gènes cibles des médicaments ou encore au niveau des gènes impliquées dans les voies de détoxification, ainsi qu'au niveau des gènes intervenant dans les processus de réparation de l'ADN peuvent peser sur l'activité de ces molécules chimiothérapeutiques. Dans ce contexte, les études de pharmacogénétique prennent une place de plus en plus importante permettant d'évaluer l'impact de ces facteurs spécifiques du patient sur la tolérance au traitement [Gamelin *et al.*, 2007].

En conséquence nous nous sommes intéressés à la recherche des facteurs prédictifs de l'efficacité et de la tolérance aux traitements utilisant principalement les trois molécules (5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine), afin d'aider le clinicien à choisir la stratégie thérapeutique la plus adaptée pour mieux cibler les patients. L'individualisation thérapeutique en fonction du profil pharmacogénétique du chaque patient, rendra possible, d'un côté, la diminution des toxicités et, d'un autre côté, l'augmentation de l'efficacité du traitement, accompagnée de l'amélioration de la qualité de vie des patients.

##### **III.1.1. Identification des facteurs génétiques influençant la tolérance et l'efficacité de l'Irinotécan dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques**

###### **i. Présentation du travail**

- ii. Résultats
- iii. Discussion
- iv. Publications 1 et 2

### III.1.1.1. Présentation du travail

En 2007, au sein de notre laboratoire il a été montré qu'une analyse pharmacogénétique préalable au traitement par 5-FU, sur leucocytes circulantes, permettait de façon simple et reproductible d'isoler une population de mauvais pronostic sur la survie globale. Il s'agissait des patients porteurs de génotypes 3R/3R pour la TS et homozygote sauvage pour les mutations A1298C ou C677T de la MTHFR [Capitain *et al.*, 2007]. Pour cette population une prise en charge thérapeutique différente, tant en situation adjuvante qu'en situation métastatique, pourrait être envisagée. Ainsi, en situation adjuvante, particulièrement chez des sujets âgés porteur d'un génotype de bon pronostic, un schéma par LV5FU2 (5-FU associé à l'acide folinique) pourrait être préféré par rapport au schéma plus toxique qui est le FOLFOX (5-FU associé à l'Oxaliplatine). Par contre, en situation métastatique, quand la résecabilité est inenvisageable et quand les patients présentent également un génotype de mauvais pronostic concernant la TS et la MTHFR, un schéma intensifié avec Irinotécan ou Oxaliplatine pourrait être alors plutôt préféré.

Par ailleurs, il a été suggéré que pour les régimes de traitements combinant 5-FU/acide folinique avec Irinotécan ou Oxaliplatine, ces deux molécules anticancéreuses, notamment Irinotécan et Oxaliplatine, pouvaient en quelque sorte « annuler » les facteurs génétiques liés au métabolisme du 5-FU, ce qui pourrait, au moins en partie, expliquer les résultats contradictoires observés dans la littérature [Marcuello *et al.*, 2004].

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'analyser, par des études de pharmacogénétique sur une population homogène de patients présentant un cancer colorectal métastatique sous traitement par FOLFIRI, non seulement des polymorphismes isolés, mais un ensemble des polymorphismes afin d'apporter des éléments de compréhension sur la variabilité de réponse et de toxicités permettant un meilleur rationnel dans l'utilisation de l'Irinotécan. Nous avons ainsi pu rechercher d'éventuelles corrélations entre TS, MTHFR et UGT1A1, avec les taux de réponses et les survies sans progression et survie 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'UGT1A1 pour confirmer ou non les résultats déjà publiés sur la tolérance clinique et hématologique de l'Irinotécan (aucune réduction de dose n'avait été effectuée en cas de génotype *UGT1A1*\*28 homozygote).

Par ailleurs, un autre gène appartenant à la famille de UGTs - UGT1A7 – a été proposé comme un facteur génétique de risque de susceptibilité génétique de cancer, du fait de l'association de ses variantes génétiques avec, d'une part, le cancer gastro-intestinal et hépatique [Vogel *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001] et, d'autre part, avec le cancer colorectal [Strassburg *et al.*, 2002]. De plus, une étude relativement récente a indiqué que SN-38 est soumis à un important processus de glucuronidation par UGT1A7, qui a été trouvé à 5 fois plus élevé que les taux détectés suite à une glucuronidation réalisée avec UGT1A1, UGT1A6 ou UGT1A10 [Lankisch *et al.*, 2005]. Ces résultats ont confirmé les observations ressortant d'un article de Ciotti et ses collaborateurs qui ont montré que UGT1A7 glucuronide le SN-38 a un niveau plus élevé que de tous les autres isoenzymes de la famille des UGTs [Ciotti *et al.*, 1999]. Compte tenu de ces informations nous avons voulu analyser l'impact du statut de l'UGT1A7 sur la tolérance clinique et hématologique d'un traitement à base de l'Irinotécan. Les résultats obtenus ont fait le sujet d'une deuxième étude soumise à publication et présentée par la suite.

Les résultats des deux publications seront discutés ensemble car ont le même rationnel et se basent sur la même cohorte de patients.

### III.1.1.2. Résultats

Notre travail rétrospectif monocentrique a donc étudié une population de patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique sur une période comprise entre octobre 1999 à 2005. La cohorte étudiée comporte 90 patients. 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 3/4 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

## CHAPITRE 3

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 (*Table I, Publication 1 ; Table II, Publication 2*).

**La répartition des génotypes dans la population étudiée** correspondait aux données rapportées habituellement dans la littérature notamment 24,4% 2R/2R pour la TS. 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 DPD. Parmi nos patients, pour les mutations de l'UGT1A1, nous avons détecté 2 génotypes décrits dans la littérature comme étant des génotypes rares [Beutler *et al.*, 1998] : 5/6 et 5/7. Aucun patient n'a pas été trouvé porteur des mutations G71R et Y486D. Cette observation concorde avec les données de la littérature, relatant que ces mutations sont présentes chez les asiatiques et absentes chez les caucasiens [Lampe *et al.*, 1999]. 13,4% de la population étudiée présentaient un syndrome de Gilbert (homozygotie pour l'UGT1A1\*28) (*Table II, Publication 1*). Les résultats obtenus pour la mutation N129/131K de l'UGT1A7 sont, eux aussi, en accord avec des résultats déjà présentés [Guillemette *et al.*, 2000]. Il a été montré que les polymorphismes UGT1A7\*2 et UGT1A7\*3 sont plus souvent rencontrés par rapport aux autres isoformes (les fréquences des allèles : 0,15 - 0,62) [Villeneuve *et al.*, 2003 ; Guillemette *et al.*, 2000] (*Table III, Publication 2*).

Une différence significative concernant l'âge et l'état général entre les populations selon le polymorphisme a été retrouvée (PS pour l'UGT1A1 ( $p = 0,045$ ) et âge pour la TS ( $p = 0,003$ )). Elle a été prise en compte par la suite pour les recherches statistiques de corrélations entre les différents génotypes et les réponses/toxicités observées. Ceci afin 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* (PS) 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 de l'asthénie (25,6%). Les nausées-vomissements étaient bien contrôlées, 11,7% de grade 1-2, sous traitement antiémétique. Concernant la toxicité hématologique,

## CHAPITRE 3

2,8% seulement de neutropénies de grade 3-4 ont été rapportées (**Table III, Publication 2 ; Table IV, Publication 2**).

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les différents effets secondaires rapportés et les génotypes de la TS ou de la MTHFR, contrairement à l'étude précédente [Capitain *et al.*, 2007]. Chez les 3 patients présentant une mutation hétérozygote de la DPD, 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 mutée 7/7 pour l'*UGT1A1*\*28 (n =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 liées au statut *UGT1A1*\*28 7/7 (avec un risque relatif de 3,3) sans atteindre toutefois la significativité (p=0,058, O.R. = 3,4 IC 95% [0,74 ; 15,6]). Par contre aucune différence n'était retrouvée avec les génotypes 6/7 et 6/6 (**Table IVa et b, Publication 1**).

Les résultats de notre deuxième étude (**Publication 2**) montrent que la recherche des génotypes d'*UGT1A7* pourrait être utile pour la prédiction des toxicités graves à l'Irinotécan. Nous avons remarqué que les deux polymorphismes de l'*UGT1A7* (N129/K131 et W208R) ont manifesté un effet statistiquement significatif sur l'apparition des diarrhées et neutropénies de grade 3/4 (respectivement p = 0,056 et p = 0,059). En effet, nous avons montré que les patients porteurs du génotype T/C de la mutation W208R de l'*UGT1A7* ont plus de risque par rapport aux patients avec un génotype non-muté (T/T) de faire des diarrhées et des neutropénies graves (O.R = 2,49 IC 95% [0,55 ; 11,31]). Notons également que le génotype T/T C/C G/G de la mutation N129/131K pourrait représenter aussi un facteur génétique de risque pour les toxicités limitantes d'un traitement à base de l'Irinotécan : les diarrhées et les neutropénies (p = 0,056) (**Table V, Publication 2**).

**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 (**Table VI, Publications 1 et 2**). On pouvait néanmoins noter un net infléchissement des taux de réponse objective dans la population *UGT1A1*\*28 7/7 (16,7% comparés aux 40 à 50% pour les autres génotypes) avec un p = 0,054 (test de Pearson), très proche donc de la significativité (**Publication 1**).

**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, similaire 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 des facteurs de mauvais pronostic. Les patients hétérozygotes A/C pour la mutation A1298C du MTHFR avaient une survie globale statistiquement plus courte en analyse uni comme en multivariée ( $p=0,04$  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 TS n'était pas significativement lié à la survie globale (*Table V, Publication 1*). Concernant le statut UGT1A1, il semblait exister une tendance négative sur la survie en cas syndrome de Gilbert (non significatif), par rapport aux autres génotypes. Le statut hétérozygote 6/7 de l'UGT1A1 semblait, lui, au contraire de bon pronostic sur les courbes de survies construites selon le test de Log rank (tendance cependant non significative, y compris en régression logistique selon Cox) (*Table V et VI, Publication 1 ; Table VII, Publication 2*).

Par l'intermédiaire de notre deuxième étude nous avons montré que la présence de la mutation W208R de l'UGT1A7 a un impact significatif sur la survie des patients. Nous avons ainsi constaté que les patients porteurs d'un génotype C/C ont présenté un risque de décès ainsi qu'un risque de progression 2 fois plus importante que les patients avec un génotype T/T (respectivement  $p = 0,009$  et  $p = 0,004$ ) (*Table VII, Publication 2*). En effet, en termes de durée de survie globale et de survie sans progression les patients avec un génotype non-muté ont présenté des médianes de survie plus longues (respectivement SG : 840 jours vs 382 jours,  $p = 0,0062$  et SSP : 191 jours vs 107 jours,  $p = 0,0027$ ).

### III.1.1.3. Discussion

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces deux études. Tout d'abord, les résultats présentés dans la **Publication 1** démontrent clairement que l'utilisation de l'Irinotécan 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 (essentiellement TS et MTHFR), ce qui d'ailleurs était notre hypothèse de départ. En résumé, en fonction des données qu'on a actuellement il ne semble donc pas utile de rechercher ces statuts en situation pré-thérapeutique en cas d'utilisation d'un protocole FOLFIRI. Cette recherche, encadrant les polymorphismes de la TS 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

## CHAPITRE 3

survie globale d'un schéma simplifié de type LV5FU2, donc il apparaît clair que certains patients sélectionnés peuvent tirer un réel bénéfice au prix d'une bien moindre toxicité.

En second lieu, le suivi pharmacocinétique de doses pour le 5-FU couplé à la recherche systématique des mutations délétères les plus fréquentes de la DPD associée au calcul pré-thérapeutique du rapport  $UH_2/U$ , 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.

Concernant spécifiquement le statut UGT1A1, nous avons fait l'hypothèse au vu de nos résultats, que le statut *UGT1A1*\*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 élevé. Ce taux de toxicité augmenté pourrait en effet entraîner des diminutions de doses combinées de 5-FU/Irinotécan, de 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 », 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/m<sup>2</sup> pour l'Irinotécan (dose standard du FOLFIRI réalisée tous 15 jours) réalisée en première ligne métastatique, alors même que la population 6/6 est, elle, probablement « sous-dosée ». Finalement le schéma posologique à 180 mg/m<sup>2</sup> du FOLFIRI retenu au cours du développement de l'Irinotécan, 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'UGT1A1. 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 de dose prenant en compte le statut UGT1A1 trouve là sa justification.

Enfin, au regard de l'UGT1A7 nous avons testé l'hypothèse que les polymorphismes touchant ce gène peuvent également influencer la tolérance et l'efficacité de l'Irinotécan. Les résultats que nous avons présentés dans la deuxième publication sont à ce titre prometteurs. En effet, les patients présentant un génotype homozygote muté pour la mutation N129/131K de l'UGT1A7 ont manifesté plus de risque de diarrhées et neutropénies graves (grades 3/4) par rapport aux patients avec un génotype sauvage. Donc comme dans le cas des patients porteurs d'un génotype 7/7 pour l'UGT1A1, les patients avec un génotype muté pour la mutation N129/131K de l'UGT1A7 métabolisent moins bien le SN-38 d'où le risque de diarrhées, neutropénies et un pronostic vital moins bon. Concernant les patients hétérozygotes pour cette mutation de l'UGT1A7, ils ont présenté un taux très faible de toxicité à la dose de 180 mg/m<sup>2</sup> d'Irinotécan. Pour eux, cette dose semble correspondre à leur capacité de métaboliser l'Irinotécan considérant l'UGT1A7.

L'UGT1A7 est exprimée dans la partie proximale du tractus gastro-intestinal, mais pas au niveau du foie. Cette distribution peut jouer un rôle important dans la distribution du SN-38 dans l'intestin. La présence des mutations N129/131K est associée à une diminution de l'activité enzymatique de l'UGT1A7 et donc à un processus de glucuronidation du SN-38 moins efficace. Ainsi, dans le cas des patients porteurs de cette mutation, la molécule SN-38, toxique, peut se régénérer et peut provoquer au sein du tractus gastro-intestinal de lésions de la muqueuse conduisant à la diarrhée. Par ailleurs, il est possible que l'UGT1A7 soit exprimé (que ce soit de manière constitutive ou inductible) dans des tissus encore indéterminés, cela pourraient influencer la distribution du SN-38.

En conclusion, ce polymorphisme peut être un facteur génétique prédictif, aussi intéressant que l'UGT1A1, pour les toxicités limitantes de l'Irinotécan et une adaptation de dose pourrait améliorer les résultats thérapeutiques.

Au cours de cette étude nous avons également trouvé que la mutation W208R d'UGT1A7 est un marqueur génétique associé à la survie au traitement. A notre connaissance cette étude est la première qui montre un effet significatif de la mutation W208R de l'UGT1A7 sur la survie des patients recevant une chimiothérapie associant 5-FU et Irinotécan, dans le protocole FOLFIRI (**Publication 2**). En effet, jusqu'à aujourd'hui, seulement quelques travaux de recherche ont examiné l'association pharmacogénétique de l'UGT1A7 chez les patients recevant de l'Irinotécan [Ando *et al.*, 2002 ; Carlini *et al.*, 2005 ; Cecchin *et al.*, 2009]. Par contre, les résultats découlant de ces études sont assez contradictoires. D'une part les résultats présentés dans le travail d'Ando ont montré qu'il n'y



## CHAPITRE 3

avait pas de corrélation entre les polymorphismes de l'UGT1A7 et l'apparition des toxicités [Ando *et al.*, 2002]. En même temps, quelques détails ont pu modifier la puissance de détection d'une telle association. Par exemple, l'étude de cette équipe a été réalisée sur une population des patients japonais qui présentaient une fréquence basse des polymorphismes de l'UGT1A7.

D'autre part, les résultats présentés par Cecchin et ses collaborateurs ont mis en évidence que le génotype *UGT1A7\*3/\*3* est le facteur génétique associé à l'apparition d'une toxicité hématologique grave et non *UGT1A1\*28* [Cecchin *et al.*, 2009]. Par contre, Carlini et ses collaborateurs ont trouvé que les génotypes de l'UGT1A7 peuvent être des facteurs prédictifs pour les toxicités ainsi que de la réponse à l'Irinotécan dans un protocole chimiothérapeutique combinant la Capécitabine et l'Irinotécan [Carlini *et al.*, 2005].

**III.1.1.4. Publication 1**

**The influence of pharmacogenetic polymorphisms on 5-fluorouracil and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer. (*Soumis à publication*)**

Capitain, Olivier (MD)<sup>1,2</sup>, Asevoaia, Andreea<sup>1</sup>, Boisdron-Celle, Michèle<sup>1</sup> (PharmD-PhD), Poirier Anne.Lise.<sup>3</sup>, Guerin-Meyer, Véronique<sup>2</sup> (MD), Morel, Alain<sup>1</sup> (PhD), Gamelin, Erick<sup>1,2</sup>(MD-PhD).

<sup>1</sup>Laboratory of Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U892, Université d'Angers

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology,

<sup>3</sup>Department 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: 28 pages

Tables: 7

Figures: 1

References: 36

Appendices: 1

Abstract: 269 words

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

### KEYWORDS

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

### ABSTRACT

Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DYPD), Thymidylate Synthase (TS) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) polymorphisms are predictive of 5-FU life-threatening toxic effects and shorter survival time in LV5FU2 regimen. UGT1A1 is involved in irinotecan detoxification pathway. In this current study we evaluated the potential correlation between polymorphisms of these specific enzymes, and clinical outcome and safety parameters in patients with metastatic colorectal cancer treated by combination pharmacokinetic adapted 5-FU/Leucovorin with irinotecan chemotherapy (tailored FOLFIRI regimen). Ninety patients were investigated considering a panel of 9 germinal genotypes. Initial 5-FU dose was tailored using pharmacokinetic monitoring. In cases of DPD SNPs, initial 5-FU dose was reduced but irinotecan dose was not reduced for UGT1A1\*28 7/7 genotype (Gilbert's syndrome). Overall response rate was 42.3%, and median overall and progression-free survivals were 27.4 and 7 months respectively. Under tailored FOLFIRI regimen, only 25 severe adverse events (3-4 grades) were notified. 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 trend to a shorter response rate (16.7%) observed (NS). 3R/3R for TS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298A>C had no impact on patients survivals as previously described.

In conclusion, after pre-therapeutic DPD genotyping followed by 5-FU monitoring, specific 5-FU toxic side-effects incidence was low (8.7%) and efficacy of tailored FOLFIRI high. Irinotecan addition cancelled out TS and MTHFR as 5-FU predictive factors of resistance. UGT1A1\*28 7/7 genotype was associated with a higher risk of severe diarrhea and neutropenia and a shorter overall response rate. Finally 5-FU pharmacokinetic adaptation, DYPD and UGT1A1\*28 genotyping should be considered for optimizing of 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 20% of response rate with monotherapy and about 25% by adding a folinic acid, 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 (TS)*, 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 12<sup>th</sup> nucleotide of the second repeat in the 3R allele that can stop USF-1 binding and decrease transcriptional activity **(6-8)**; *Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)*, 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 **(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 that we can easily discriminate patients with a high risk of life-threatening toxicity (DPD's Single Nucleotide Polymorphisms and C/C for MTHFR 1298 A>C), and with a predicted shorter survival time (3R/3R TS genotype associated with C/C for 677 C>T or A/A for 1298 A>C) concerning only 5-FU and leucovorin based regimen **(12)**.

## CHAPITRE 3

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 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)<sub>7</sub>TAA for the promoter genotype), so-called Gilbert's syndrome, are 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**). Currently, the UGT1A1\*28 genotype is clearly considered as a predictive biomarker of toxicity in cancer patients receiving irinotecan.

The purpose of this present study was to determine predictive factors of tumor response, tolerance and survival times, to FOLFIRI regimen with 5-FU pharmacokinetic adaptation, 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 TS, DPD, MTHFR and UGT1A1\*28 genotypes as predictive factors of treatment outcome.

### PATIENTS AND METHODS

#### *Patients*

This retrospective observational 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 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 (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 metastatic lesions were measured.

#### *Chemotherapy regimen description*

Irinotecan was administered every 2 weeks, before 5-FU treatment, for 2 hours. The initial dose was 180mg/m<sup>2</sup>, 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/m<sup>2</sup> of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m<sup>2</sup> of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m<sup>2</sup> 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 DPD 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 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

## CHAPITRE 3

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 period between the date of 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 TS, DPD, MTHFR and UGT1A1\*28 polymorphisms. For each batch, appropriate positive and negative controls of established genotypes were assayed.

### *The determination of TS polymorphisms and G>C single nucleotide polymorphism*

The determination of the double polymorphism of TS has been described in a previous study (12). Briefly, a fragment of TS 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 QIAquick™ 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 DPD and MTHFR polymorphisms*

As previously described (12), the analysis of DPD and MTHFR polymorphisms was based on pyrosequencing technology (bioluminometric real-time sequence determination). For DPD polymorphisms, four SNPs, associated with severe DPD 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



## CHAPITRE 3

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  $\chi^2$  test and Fisher's exact Test were used for the comparison of different frequencies. The  $\alpha$  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  $\chi^2$  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 had benefited of a second, third and fourth line respectively. FOLFIRI has been reused in third or fourth line in 8%. 75% of global 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) in metastatic treatment setting.

**Table II** lists the distribution of TS, DPD, 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 (TS 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 DPD 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 ( $\leq 75$  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 TS polymorphisms ( $p=0.003$ ). These results were considered for 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

## CHAPITRE 3

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 DPD 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 TS polymorphism, TS 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 DPD SNP, had a 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 were with a higher risk of toxicity than UGT1A1\*28 6/6 ( $p=0.058$ , 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 treatment 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 notified.

### *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 2,287; 95%CI, 1,08 to 4,85).

Heterozygotes A/C for MTHFR A1298C were with a higher risk for 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 TS genotypes was not significant. Risk of overall survival times were very similar for different TS polymorphisms: ( $p=0,7437$  with respectively OR 1,28; 95%CI, 0,67 to 2,46 and OR 1,11; 95%CI, 0,51 to 2,41), contradicting previous observations with 5-FU monotherapy (**12**); no difference was found between overall survival time and 'High' or 'Low' TS expression (**Table IV and V**).

Finally, we found no significant difference between the overall survival time of the patients with a 3R/3R TS 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 of 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 polymorphism 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 prevent and treat it?

Retrospective and prospective studies have been carried out, looking for a correlation between tumor molecular characteristics or constitutional factors and resistance parameters, percentage of response, time to progression, or overall survival time, with the aim of determining biomarkers which would help clinicians to choose the appropriate combination and to determine optimal drug therapy (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 TS, MTHFR, DPD (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 DPD 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 DPD were at a higher risk of toxicity. Two populations

## CHAPITRE 3

could be as well individualized for a significantly shorter survival time (3R/3R TS 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, for instance irinotecan, with a different metabolic pathway and mechanism of action, reduce or even abolish the influence of 5-FU-tumour resistance biomarkers on tumor response rate and patients' progression-free survival? To test this hypothesis, we retrospectively studied a population of patients with advanced colorectal cancer treated with a Folfiri regimen, using both 5-FU plus folinic acid and irinotecan based on the so-called Folfiri regimen. In our medical department, the 5-FU dose was individually tailored from a simple sample of blood, based on a dose adjustment chart (23-24).

We investigated TS, MTHFR, and DPD 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 ( $p=0.0311$ ).

Concerning 5-FU biomarkers, we found no impact of TS, MTHFR and DPD genotypes on combination tolerance. Likewise, we found no impact of TS polymorphisms and expression,

or MTHFR genotype on tumor response, on overall and progression-free patient survival. Clearly, the addition of irinotecan to 5-FU stops 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) ( $p=0.583$ ; OR 3.400; 95%CI, 0.74 to 15.60). Interestingly, there was 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 several accumulated treatment pauses, and consequently, a loss of efficacy by treatment interruptions. The better overall survival time median for the 6/7 group could be linked to a more appropriate dose of irinotecan ( $180\text{mg/m}^2$ ) 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 0.734; 95%CI, 0.41 to 1.30). For these last patients, the initial dose of irinotecan ( $180\text{mg/m}^2$ ) 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 TS and MTHFR do not have to be determined before 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). We must keep in mind that irinotecan itself adds some severe toxic side

## CHAPITRE 3

effects. If treatment intensification is obviously established in patients with operable or potentially operable metastases -whatever the pretherapeutic biological parameters-, for patients with widespread metastases, that 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 not pointless. 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/m<sup>2</sup>) in cases of 6/6 status genotype for UGT1A1\*28, then a progressive intensification until 320mg/m<sup>2</sup> 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, 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.
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 Invest* 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 (%)
<b>Gender</b>	
<b>Male</b>	62 (69)
<b>Female</b>	28 (321)
<b>PS</b>	
<b>0-1</b>	86 (95.5)
<b>2-3</b>	4 (4.5)
<b>Median age (years)</b>	64.5
<b>Range (years)</b>	23-82
<b>Tumor site</b>	
<b>Colon</b>	69 (76.6)
<b>Rectum</b>	21 (23.4)
<b>Metastatic site</b>	
<b>Unique site</b>	
<b>Liver</b>	53 (58.9)
<b>Lung</b>	11(12.2)
<b>Peritoneal Carcinomatosis</b>	6 (6.7)
<b>Nodes</b>	2 (2.2)
<b>Number of sites &gt; 1</b>	18 (20)
<b>First line of treatment</b>	84 (93.3)

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

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

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

**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
<b>Age</b>		0.6420		0.2635
<75 years old	1		1	
≥ 75 years old	1.412 [0.330; 6.042]		2.704 [0.473; 15.462]	
<b>Performance Status</b>		0.4865		0.4395
<b>0.1</b>	1		1	
<b>2-3</b>	0.441 [0.044; 4.417]		2.534 [0.240; 26.758]	
<b>Polymorphism TS</b>		0.9617		0.7856
<b>2R/2R</b>	1			
<b>2R/3R</b>	1.144 [0.404; 3.240]		1.027 [0.231; 4.567]	
<b>3R/3R</b>	1.032 [0.319; 3.341]		0.576 [0.087; 3.817]	
<b>Expression TS</b>		0.9682		0.5950
<b>Low</b>	1		1	
<b>High</b>	1.018 [0.422; 2.456]		1.464 [0.359; 5.963]	
<b>MTHFR 677 C&gt;T</b>		0.8425		0.7415
<b>C/C</b>	1		1	
<b>C/T</b>	1.125 [0.459; 2.758]		1.655 [0.460; 5.850]	
<b>T/T</b>	1.500 [0.379; 5.936]		NV	
<b>MTHFR 1298 A&gt;C</b>		0.4945		0.5348
<b>A/A</b>	1		1	
<b>A/C</b>	0.978 [0.403; 2.373]		1.031 [0.256; 4.154]	
<b>C/C</b>	2.444 [0.506; 11.804]		2.750 [0.408; 18.522]	
<b>UGT 1A1*28</b>		0.1302		<b>0.0583</b>
<b>6/6</b>	1		1	
<b>6/7</b>	1.513 [0.618; 3.704]		0.368 [0.067; 2.021]	
<b>7/7</b>	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
<b>Performance Status</b>		0.7355
<b>0.1</b>	1	
<b>2-3</b>	1.591 [0.108; 23.501]	
<b>UGT 1A1*28</b>		<b>0.0764</b>
<b>6/6</b>	1	
<b>6/7</b>	0.357 [0.064; 1.988]	
<b>7/7</b>	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
<b>Age</b>		<b>0,0311</b>		<b>0,0120</b>
<75 years old	1			
≥ 75 years old	2,287 [1,078;4,854]		2,741 [1,248; 6,023]	
<b>Performance Status</b>		<b>0,0010</b>		
0.1	1			
2-3	5,785 [2,027; 16,508]		6,641 [2,189; 20,144]	<b>0,0008</b>
<b>Polymorphism TS</b>		0,7437		
2R/2R	1			
2R/3R	1,280 [0,666; 2,460]			
3R/3R	1,114 [0,514; 2,413]			
<b>Expression TS</b>		0,7817		
Low	1			
High	1,081 [0,625 ; 1,868]			
<b>MTHFR 677 C&gt;T</b>		0,8884		
C/C	1			
C/T	0,867 [0,488; 1,542]			
T/T	0,951 [0,416; 2,173]			
<b>MTHFR 1298 A&gt;C</b>		<b>0,0416</b>		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]	
<b>UGT 1A1*28</b>		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
<b>Age</b>		<b>0,020</b>		<b>0,041</b>
<75 years old	1			
≥ 75 years old	2,242 [1,150; 5,106]		3,001 [1,048; 8,592]	
<b>Performance Status</b>		0,117		
<b>0.1</b>	1			
<b>2-3</b>	2,250 [0,816; 6,205]			
<b>Polymorphism TS</b>		0,089		0,100
<b>2R/2R</b>	1			
<b>2R/3R</b>	0,554 [0,324; 0,948]		1,284 [0,581; 2,838]	
<b>3R/3R</b>	0,780 [0,426; 1,427]		2,376 [0,889; 6,353]	
<b>Expression TS</b>		<b>0,005</b>		<b>0,005</b>
<b>Low</b>	1			
<b>High</b>	0,516 [0,326; 0,816]		0,327 [0,150; 0,709]	
<b>MTHFR 677 C&gt;T</b>		0,437		
<b>C/C</b>	1			
<b>C/T</b>	1,223 [0,768; 1,947]			
<b>T/T</b>	0,761 [0,356; 1,627]			
<b>MTHFR 1298 A&gt;C</b>		0,835		
<b>A/A</b>	1			
<b>A/C</b>	0,895 [0,564; 1,420]			
<b>C/C</b>	1,085 [0,499; 2,357]			
<b>UGT 1A1*28</b>		0,771		
<b>6/6</b>	1			
<b>6/7</b>	0,981 [0,612; 1,571]			
<b>7/7</b>	1,666 [0,394; 7,045]			



FIGURES

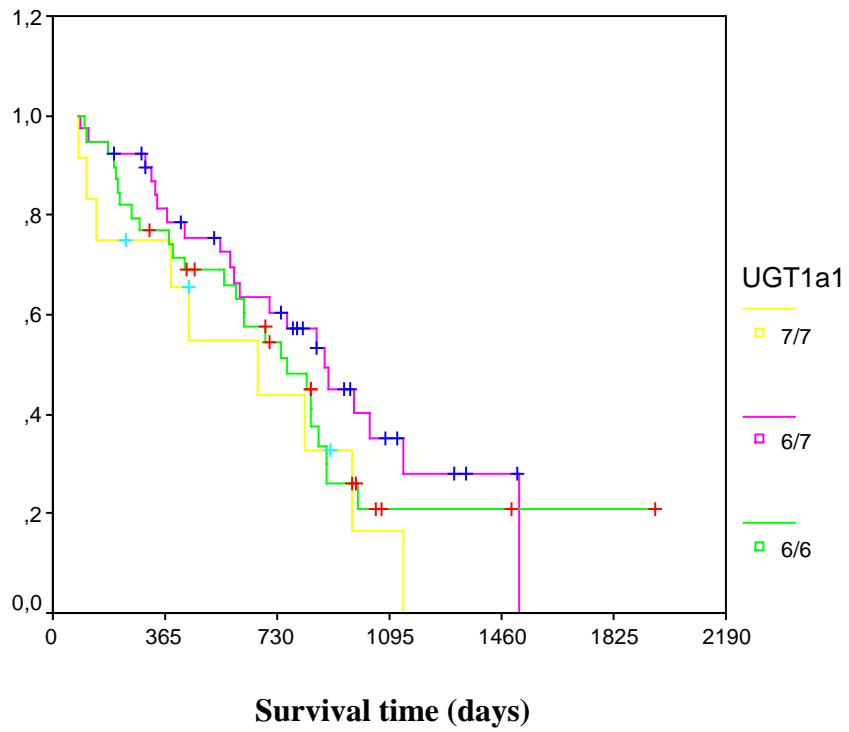


Figure 1. Univariate overall survival of patients according to UGT 1A1 genotypes

## APPENDICES

*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		
<b>DPD</b> <b>Chromosome 1p</b>	<b>IVS14+1G&gt;A</b>	<b>Intron 14</b>	atcagtgagaaaacggctgc	taaacattcaccaacttatgccca	aggetgactttccaga	150
	<b>464 T&gt;A</b>	<b>5</b>	ttatggagctgctaagatga	atcatacatacctcagtagcaaa	cccattaatattggt	200
	<b>1679 T&gt;G</b>	<b>13</b>	aatatggagcttccgtttct	gagagaaaagtttgggtgagg	ccagccaccagcacatcaa	204
	<b>2846 A&gt;T</b>	<b>22</b>	aagcactgcagtaccttggaa	tcatgtagcatttaccacagtga	gcaagttgtggctatga	107
<b>MTHFR</b> <b>Chromosome</b>	<b>677 C&gt;T</b>	<b>4</b>	tattggcaggttaccctaaa	ctcacctggatgggaaagat	agaaggtgtctgcgg	208
	<b>1298 A&gt;C</b>	<b>7</b>	gccaggggcaattcctct	cttcagcatcactcactttgt	ggagctgaccagtgaag	202

**III.1.1.5. Publication 2**

**Predictive value of the genetic marker UGT1A7 in irinotecan-treated colorectal cancer patients**

Asevoaia, Andrea<sup>1</sup>, Capitain, Olivier<sup>1,2</sup>, Boisdron-Celle, Michele<sup>1</sup>, Poirier, Anne-Lise<sup>3</sup>, Gamelin, Erick<sup>1,2</sup>, Morel, Alain<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oncopharmacology-pharmacogenetics Laboratory, Cancer Centre Paul Papin, Inserm U892, University of Angers, Angers, France

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology and Clinical Pharmacology, Cancer Centre Paul Papin, University of Angers, Angers, France

<sup>3</sup>Department of Statistics and Data Management, Cancer Centre Paul Papin, University of Angers, Angers, France

**Corresponding author:** Alain Morel

**Cancer Centre Paul Papin**

**Oncopharmacology-pharmacogenetics laboratory**

**Inserm U892**

**2 rue Moll**

**49033 Angers Cedex**

**France**

**Telephone: +33 2 4135 2700**

**Fax: +33 2 4135 2722**

**E-mail: a.morel@angers.fnlcc.fr**

**ABSTRACT**

Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT1A7) polymorphisms correlated with irinotecan toxicity, response and survival in colorectal cancer patients treated with irinotecan/5-fluorouracil. UGT1A1\*28 7/7 genotype was associated with higher risk of severe diarrhea and neutropenia and a lower response rate. T/T C/C G/G genotypes of the UGT1A7 N129/131K polymorphism were important predictive markers for severe diarrhea and neutropenia (p=0.056, OR 1.84; 95% CI [0.38; 8.95]). UGT1A7 W208R is associated with longer survival (p = 0.009) and progression-free survival (p = 0.004). UGT1A7 N129/131K polymorphisms significantly impact the occurrence of irinotecan toxicity in UGT1A1\*28 6/6 genotypes. Genotyping UGT1A1\*28 and UGT1A7 may optimize FOLFIRI regimens.

**Running Title:** UGT1A7 in irinotecan-treated CRC patients

**Keywords:** irinotecan; colorectal cancer; UGT1A1; UGT1A7; genetic marker; toxicity

**Abbreviations:** confidence interval (CI); fluorouracil (FU); FOLFIRI: folic acid + fluorouracil + irinotecan; irinotecan (CPT-11); odds ratio (OR); overall response rate (ORR); overall survival (OS); progression-free survival (PFS); single-nucleotide polymorphism (SNP); uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1); uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A7 (UGT1A7)

### INTRODUCTION

Irinotecan (Camptosar®, CPT-11) is a semi-synthetic analogue of camptothecin. It is approved worldwide for the treatment of colorectal cancer [1], and is used in combination with 5-FU and leucovorin for advanced colon cancer [2,3]. Irinotecan is a prodrug, activated by carboxylesterase to SN-38, a potent topoisomerase 1 inhibitor which is more cytotoxic *in vitro* than the parent drug [4]. SN-38 is detoxified via glucuronidation by uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs) including hepatic UGT1A1, UGT1A6, and UGT1A9, and extrahepatic UGT1A7 [5,6,7,8]. Although SN-38 undergoes significant biliary and urinary excretion [9], severe diarrhea and leucopenia are dose-limiting, and are often associated with increased levels of SN-38 [10].

Polymorphisms of drug metabolizing enzymes play an important role in clinical response to therapeutic drugs [11] and occurrence of severe toxicities [12]. Pharmacogenetic studies of irinotecan have been focused on common UGT1A1 polymorphisms [13], notably in the upstream promoter region of the UGT1 gene with a variant TATAA element. The six-repeat allele (6/6) is considered to be the wild type (45% of patients). UGT1A1\*28 is a seven-repeat allele (10% of patients) [14].

There is an inverse relationship between the number of UGT1A1 repeats and its level of expression [15]. In Gilbert's syndrome, the UGT1A1\*28 allele is associated with a 30% reduction in the UGT1A1 promoter activity [16], and a higher incidence of irinotecan toxicity. The UGT1A1\*28 genotype is an important pharmacogenetic predictor marker of irinotecan-related toxicity [13,17,18,19].

Irinotecan and SN-38 undergo glucuronidation by other members of the UGT family [5], notably the polymorphic isoenzyme UGT1A7 [20] expressed uniquely in intestinal tissue [21]. Several missense mutations of UGT1A7 have been characterized [22]. UGT1A7 alleles are defined by substitutions of four single nucleotide polymorphisms (SNP), 387T > G, 391C > A, 392G > A, and 622T > C, which alter the encoded amino acid sequences N129K, R131K, E139D, and W208R [23]. Four genotypes have been defined; UGT1A7\*1 (N129, R131, and W208), UGT1A7\*2 (K129 and K131), UGT1A7\*3 (K129, K131, and R208), and UGT1A7\*4 (R208) [22]. A recent study showed that SN-38 glucuronidation by UGT1A7 was five times higher than with UGT1A1 [24]. It is thus likely that UGT1A7 plays a role in the development of irinotecan-related toxicities. However data on the association of the UGT1A7

## CHAPITRE 3

polymorphisms and toxicity in patients receiving irinotecan-based chemotherapy are limited [23,25,26].

To elucidate the clinical importance of polymorphic UGT1A7 isoforms on the prediction of irinotecan toxicity, we aimed to correlate toxicity and efficacy of combined irinotecan /5-fluorouracil (5-FU) therapy in metastatic colorectal cancer patients with genetic variations in UGT1A1 and UGT1A7. A rapid method of genotyping UGT1A7 polymorphisms was developed using pyrosequencing technology. The predictive value of UGT1A1 in terms of toxicity, response and time-related parameters was also analyzed to provide a direct comparison of the relative value of UGT1A7 as a genetic predictive marker.

## **PATIENTS AND METHODS**

### ***Patients***

A cohort of 90 French patients with advanced cancer colorectal who had received treatment with irinotecan, 5-FU, and leucovorin, for metastatic colorectal cancer in first-line metastatic setting, in the same institute, was analyzed. Patients had to have received treatment with the FOLFIRI regimen: 180 mg/m<sup>2</sup> irinotecan biweekly 90-minute infusion, 5-FU 400 mg/m<sup>2</sup> bolus followed by 2500 mg/m<sup>2</sup> as a 46-hour continuous infusion, with L-folinic acid, 200 mg/m<sup>2</sup> as a 2-hour i.v. infusion. The schedule was repeated every 2 weeks. The 5-FU dose was adjusted according to toxicity, as presented elsewhere [27]. All patients provided written informed consent for collection of peripheral blood samples for biomolecular analysis.

All toxicities occurring throughout first-line FOLFIRI treatment were recorded and graded according to the National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC, version 2). Tumor response was measured after 3 months and analyzed according to RECIST (version 1). Responses were confirmed a minimum of 4 weeks after being documented.

Overall survival (OS) was defined as the time between the date of the start of treatment and of death, regardless of the cause. Progression-free survival (PFS) was defined as the time between the date of the start of treatment and of progression (clinical or radiological) or death. Patients without progression or lost to follow-up at the time of analysis were censored.

### ***Genotyping***

#### **Isolation of patient DNA from blood samples**

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using DNA Isolation Kits for Blood/Bone Marrow/Tissue (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each sample was controlled for DNA isolation by UV-transillumination of gels after electrophoretic separation in 1.2% agarose in a TBE/BET buffer. UGT1A1 (UGT1A1\*28) and UGT1A7 (N129/131K) polymorphisms were analyzed. Appropriate positive and negative controls of established genotypes were assayed for each batch of assays.

#### **Construction of Mutant Vectors for the Exon 1 Region of the UGT1A7 Gene**

Exon 1 of human UGT1A7 DNA containing the regions of potential mutations (N129K, K131R and W208R) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the

## CHAPITRE 3

pGEMt vector (pGEM-T vector System II; Promega, Madison, WI, USA). PCR conditions were: initial denaturation for 2 min at 94°C, followed by 32 cycles (denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 30 s at 60°C, and extension for 1 min at 72°C), with a final extension at 72°C for 5 min. Mutations were introduced using the Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands), with the primer sets F1378 (5'-Biot TGGACGGCACCATTGCGA-3') and R1359 (5'-CAAAATAAATGTTCCAAGTGC-3'). All amplifications were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq France). Constructs were characterized by direct sequencing, and used as homozygous positive controls for additional pyrosequencing analysis.

### **Analysis of Polymorphisms**

#### **UGT1A1\*28 genotypes**

UGT1A1\*28 mutations were sequenced using the technique and primers previously established in our laboratory [17]. PCR was performed with an initial denaturation for 5 min. at 95°C, followed by 35 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 minutes at 72°C. All amplifications were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) with 1 unit of Taq Polymerase (Promega; Eurobio, France).

For determination of TATAA box genotypes, two PCR fragments were designed to analyze the sequence in both forward and reverse senses to increase the reliability of the analysis. Templates were prepared as recommended by the manufacturer, and the reaction was performed at 28°C in an automated PSQ 96 instrument (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). The optimal time interval between the addition of two nucleotides to obtain the most accurate pyrograms was 120 s.

#### **UGT1A7 N129/K131 and W208R genotypes**

PCR reactions contained 50 µl of reaction mix (1X PCR Buffer (pH 8.5), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP [Invitrogen]), 10 pM of each primer and 0.5 U of Taq DNA Polymerase. All PCR reagents were from Promega Corporation and PCR primers from Eurofins MWG Operon Ebersberg, Germany. For PCR, an initial denaturation (5 min at 94°C) was followed by 35 cycles of denaturation (30 s at 94°C), primer annealing (30 s at 60°C), and extension (1 min at 72°C), followed by a final extension (5 min at 72°C). All amplification reactions were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France)



Eppendorf/Mastercycler gradient (Fischer's Scientific Laboratory). The sequencing primer for N129/131K mutations matched immediately prior to the start of exon 1. All primer sequences are described in Table I.

The polymorphism analysis 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 manufacturer's protocol, as described previously [28].

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using SPSS© version 10 software (Chicago, USA). The chi-squared and Fisher's exact tests were used to compare the allele frequency of each variant with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium. Each genotype was independently analyzed. Logistic regression analyses were performed to evaluate toxicity risk, response, and survival in univariate and multivariate analysis. A classic  $\alpha$ -error risk of 5% was selected.

Patients without progression or lost to follow-up at the time of analysis were censored. The relationship between each polymorphism and OS/PFS was analyzed using Kaplan-Meier plots and the Log-rank test. The relative odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated. Cox regression was used for univariate and multivariate survival analysis.

### RESULTS

#### **Patient characteristics**

Data were collected from 90 advanced colorectal cancer patients treated with FOLFIRI, and followed between October 1999 and August 2005. Median follow-up was 37 months (range 8.0 to 74.1). Patient characteristics are shown in Table II. Median age at the time of inclusion was 64.5 years (range 23 - 82), 96% of patients had a WHO performance status of 0 to 1, and the majority of patients were men (69%). Seventy-seven percent of patients presented with colon cancer and 23% with rectal cancer. Most patients (82%) had a single site of metastasis at inclusion, with liver metastases being the most common (59%).

The majority of patients (94%) had received treatment with FOLFIRI in a first-line setting. An additional five patients (6%) had received modified FOLFIRI regimens as first-line; four patients had weekly 90 mg/m<sup>2</sup> irinotecan), and one patient received concurrent pemetrexed. Second, third and fourth-line treatment with tailored FOLFIRI regimens was administered to 81%, 38% and 14% of patients (toxicity data not shown). Six patients (7%) had received previous treatment with 5-FU/leucovorin and oxaliplatin chemotherapy (FOLFOX) in an adjuvant setting. Overall, 75% of patients had received FOLFOX, mostly as second-line therapy, 32% had received 5-FU monotherapy (intravenously or per os), and 11% had received at least one targeted therapy (notably cetuximab and/or bevacizumab) in a metastatic setting. All patients had normal serum bilirubin levels at the start of FOLFIRI treatment.

#### **Pyrosequencing of the UGT1A7 N129/131K and W208R polymorphisms**

Pyrosequencing of the N129/131K mutations provided the theoretical sequence CTG ATC ACT ACA, and pyrosequencing of the W208R mutation gave the theoretical sequence CAG CTA CT. Figures I and II show that no interfering peaks were generated with the sequencing primers for the UGT1A7 N129/131K and W208R SNPs. The order in which nucleotides were added is indicated.

#### **Genotypes**

The TATA box polymorphism, G71R and Y486D mutations in the UGT1A1 gene, and UGT1A7 gene mutations were analyzed. The distribution of genotypes for each polymorphism is shown in Table III. Two patients with the rare 5/6 and 5/7 heterozygous

UGT1A1 genotypes [29] were identified. No patients had G71R and Y486D mutations. Thirteen percent of the patients were UGT1A1\*28 7/7 (Gilbert's syndrome), 11% presented a T/T C/C G/G genotype and 14% had a C/C genotype.

### **Correlation between polymorphisms and toxicity**

Irinotecan-related adverse events occurring under first-line FOLFIRI treatment are described in Table IV. Irinotecan-related toxicity was relatively infrequent and rarely severe, and no toxic deaths occurred. Sixteen (18%) patients in the study population experienced severe related toxicity. Five (6%) presented grade 3 diarrhea and none had grade 4. Eight patients (9%) had severe neutropenia and seven (8%) reported severe asthenia. Only one patient (1%) had grade 3 cardiac toxicity.

Table V describes a univariate analysis of all polymorphisms in relation to severe toxicity under FOLFIRI treatment. The 12 UGT1A1\*28 7/7 patients (13% of the population) were more likely to experience grade 3-4 irinotecan-related toxicity than the rest of the population (OR = 3.93, 95% CI [0.93; 16.58]) although this was not statistically significant ( $p = 0.087$ ). Among UGT1A1\*28 7/7 genotype patients, three patients had two grade 3 diarrhea events each despite symptomatic treatment, and three had grade 4 neutropenia, while there were no grade 3-4 diarrhea or neutropenic events among 6/7 genotype patients ( $p=0.036$ ).

Univariate analysis showed a correlation between severe neutropenia and diarrhea UGT1A1\*28 polymorphisms. UGT1A1\*28 7/7 patients had a higher risk of these toxicities than UGT1A1\*28 6/6 patients ( $p=0.059$ , OR 3.40; 95% CI [0.74; 15.60]), while the UGT1A1\*28 6/7 genotype correlated with less toxicity than in UGT1A1\*28 6/6 genotype patients (OR 0.37; 95% CI [0.07; 2.02]).

Grade 3-4 toxicity was analyzed in terms of each SNP using the wild type genotype as a reference. Univariate analysis showed that presence of the genetic variant T/T for W208 polymorphism correlated significantly with the occurrence of irinotecan-related grade 3-4 toxicity ( $p = 0.018$ ). The T/C genotype for the W208R polymorphism correlated with the presence of grade 3-4 neutropenia and diarrhea ( $p = 0.060$ , OR 2.49; 95% CI [0.55; 11.31]). The risk of developing severe irinotecan-related diarrhea and neutropenia in patients with C/C genotype of the W208R polymorphism was nine times greater than for those with a T/C genotype (OR = 9.33, 95% CI [1.48; 59.00]), however given the confidence interval, this result should be interpreted with caution. The T/T C/C G/G genotype of the UGT1A7 N129/131K polymorphism appears to be a genetic risk factor for severe neutropenia and

diarrhea ( $p=0.056$ , OR 1.84; 95% CI [0.38; 8.95]). No significant correlations were seen between age or performance status and occurrence of severe irinotecan-related toxicity.

### **Correlation between polymorphisms and response**

The overall response rate (ORR) (complete + partial responses) was 42.3% ( $n = 38$ ), including 7 patients (7.8%) with complete response as best response, ten patients (11.1%) with stable disease and 42 patients (46.7%) with progressive disease.

A logistic regression analysis was performed, as shown in Table VI. Patients with the 6/7 genotype UGT1A1\*28 polymorphism were more likely to respond than 6/6 genotype patients, although this was not significant (OR = 1.51, 95% CI [0.62; 3.70]). UGT1A1\*28 7/7 patients had an ORR of 16.7% compared to 40-50% for other UGT1A1 genotypes; the ORR in UGT1A1\*28 6/6 patients was three times that of UGT1A1\*28 7/7 patients.

Patients with heterozygous or homozygous mutant genotypes of the UGT1A7 N129/131K polymorphism were more likely to respond than patients with wild-type genotype (OR = 2.48, 95% CI [0.98, 6.24] and OR = 2.36, 95% CI [0.57, 9.84], respectively). However, these observations were not statistically significant ( $p = 0.144$ ). We also observed a non-significant trend that patients with T/C and C/C genotypes for the UGT1A7 W208R mutation were less likely to respond than wild type patients ( $p = 0.537$ ; OR = 0.47, 95% CI [0.12; 1.84] and OR = 0.74, 95% CI [0.30; 1.83] respectively).

### **Correlation between polymorphisms and survival**

Median OS was 27.4 months (range 20.8-29.6), and median PFS was 7.0 months (range 5.5-9.4). Univariate Cox proportional hazard regression model correlations between the polymorphisms and OS and PFS are shown in Table VII. The W208R polymorphism of UGT1A7 correlated significantly with OS ( $p = 0.009$ ) and PFS ( $p = 0.004$ ). The duration of progression-free and overall survival of patients with the T/T genotype for UGT1A7 W208R were statistically longer than those of C/C genotype patients; median survival of C/C genotype patients was 382 days versus 840 days for the T/T genotype ( $p = 0.006$ ), and median PFS was 107 days for C/C patients versus 191 for T/T ( $p = 0.003$ ). Analyses of the other polymorphisms did not show significant correlations.

### DISCUSSION

Given the narrow therapeutic index of cytotoxic drugs, along with frequent development of resistance to therapies, and expanding treatment options for colorectal cancer, the need for predictive markers of response and toxicity has assumed greater importance. Many studies have analyzed correlations between constitutional genetic factors and toxicities/resistance limits, response, survival and progression-free intervals, to identify genetic markers to guide clinicians in their choice of the best adapted chemotherapy regimen, and also to determine optimal drug concentrations.

In this study, we correlated the presence of UGT1A1 and UGT1A7 polymorphisms with the occurrence of irinotecan-related toxicities in advanced colorectal cancer patients treated with FOLFIRI, and compared UGT1A7 with UGT1A1 as a predictive marker. In our population, patient characteristics and response to FOLFIRI treatment were as expected for this population [2,3]. Genotype frequency was consistent with published data for the Caucasian population [22,30], as was the case for UGT1A1 TATA box polymorphisms; 41% for 6/6 genotype, 46% for 6/7, and 13% for 7/7 genotype (Gilbert's syndrome) [15,31,32]. The absence of G71R and Y486D mutations is consistent with the literature describing the presence of these mutations in Asians but not in Caucasians [33].

The presence of the 7/7 genotype of the UGT1A1 polymorphism correlated with a higher risk of severe diarrhea and neutropenia compared to the homozygous 6/6 genotype (OR=3.40 95% CI [0.74; 15.60]). The frequency of grade 3-4 toxicity in 7/7 patients led to several treatment interruptions, which may explain the lower (albeit not significant) ORR ( $p=0.130$ ; OR 0.29, 95% CI [0.06, 1.49]) observed in these patients. The better response rate and median OS reported in 6/7 patients compared to 7/7, may be due to an irinotecan dose (180 mg/m<sup>2</sup>) better adapted to the metabolism of these patients, and conversely the lower ORR of patients with a 6/6 genotype may be due to a too low irinotecan dose.

The UGT1A7 polymorphisms, N129/K131 and W208R, showed a trend towards correlation with the presence of severe diarrhea/neutropenia ( $p = 0.056$  and  $p = 0.060$ , respectively). Patients with a heterozygous T/C genotype for the UGT1A7 W208R mutation were more at risk of developing these toxicities compared to wild type (OR = 2.49, 95% CI [0.55, 11.31]). Presence of the T/T C/C G/G genotype of the N129/131K mutation may also be a genetic risk factor for these toxicities. All ten patients with a homozygous mutation for UGT1A7 N129/131K polymorphism had the 6/6 genotype for the UGT1A1\*28 polymorphism. This important finding may explain why patients with the 6/6 genotype presented irinotecan-

related toxicity. Patients with a heterozygous genotype for the N129/131K polymorphism were more protected against irinotecan-related toxicities than wild type (OR 0.10; 95% CI [0.01 to 0.87]). Given that 63% of patients with the heterozygous genotype for the N129/131K polymorphism also presented a heterozygous UGT1A1\*28 genotype, we assume that the irinotecan starting dose of 180 mg/m<sup>2</sup> was appropriately adapted.

No significant correlations between response and genetic markers were identified in univariate or multivariate analyses, which may be due to the relatively small population and low number of responses. However UGT1A1\*28 7/7 patients showed a trend towards a lower response rate than the other genetic profiles (p=0.130; OR 0.29; 95% CI [0.06 to 1.49]). In terms of survival, the C/C genotype of the UGT1A7 W208R polymorphism had a two-fold higher risk of death and progression compared with the T/T genotype (p = 0.009 and p = 0.005 respectively), and shorter median duration ( p = 0.006 and p = 0.003 respectively). This may be linked to the fact that heterozygous and homozygous genotypes have a lower risk of severe treatment-related toxicity (p = 0.01). This is the first demonstration of a significant effect of the W208R mutation of UGT1A7 on survival of patients receiving FOLFIRI.

In conclusion, our results for the UGT1A1 are consistent with the literature; the 7/7 UGT1A1 genotype correlated with an increased risk of severe irinotecan-related toxicity, notably diarrhea and neutropenia, along with a poor overall response and a shorter survival [15,17]. This confirms the importance of systematically evaluating UGT1A1\*28 status prior to administration of irinotecan-based treatment.

Analysis of the correlation between different UGT1A7 polymorphisms and the occurrence of irinotecan-related toxicity shows promising results; patients with a homozygous mutated genotype for the UGT1A7 N129/131K polymorphism were at higher risk of severe diarrhea and neutropenia compared with wild type. The fact that all patients with the T/T C/C G/G genotype are 6/6 for UGT1A1\*28 polymorphism could explain the prevalence of severe irinotecan-related toxicities in these patients. This observation suggests that the N129/131K polymorphism may be a predictive genetic marker for irinotecan-related toxicity, and may aid in better dose adaptation for UGT1A1\*28 6/6 patients.

The pyrosequencing technique we developed for detecting UGT1A genetic variants is rapid, reproducible, reliable, and easily implemented in the clinic [17]. Both UGT1A1\*28 and UGT1A7 polymorphic status should be routinely evaluated in order to make an informed decision on the most appropriate treatment for advanced colorectal cancer patients before administration of irinotecan-based therapy.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by « Le Comité Départemental du Maine et Loire de la Ligue Contre le Cancer » and « La Ligue Nationale de Lutte Contre le Cancer ». These funding bodies had no involvement in the study design, the collection, analysis or interpretation of the data, in the writing of the manuscript or the decision to submit the manuscript for publication. Writing assistance was provided by Medi.Axe (France), funded by the Centre Régional de la Lutte Contre le Cancer, Paul Papin.

A Asevoaia was a recipient of funding from “La Ligue Nationale de Lutte Contre le Cancer”.

### **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

No conflict of interests to declare.

### REFERENCES

- [1]. U. Vanhoefer, A. Harstrick, W. Achterrath, S. Cao, S. Seeber, Y.M. Rustum, Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview, *J Clin Oncol* 19 (2001) 1501-1518.
- [2]. L.B. Saltz, J.V. Cox, C. Blanke, L.S. Rosen, L. Fehrenbacher, M.J. Moore, J.A. Maroun, S.P. Ackland, P.K. Locker, N. Pirotta, G.L. Elfring, L.L. Miller, Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group, *N Engl J Med* 343 (2000) 905-914.
- [3]. J.Y. Douillard, D. Cunningham, A.D. Roth, M. Navarro, R.D. James, P. Karasek, P. Jandik, T. Iveson, J. Carmichael, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad, P. Rougier, Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial, *Lancet* 355 (2000) 1041-1047.
- [4]. Y. Kawato, M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, K. Sato, Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11, *Cancer Res* 51 (1991) 4187-4191.
- [5]. M. Ciotti, V.M. Lakshmi, N. Basu, B.B. Davis, I.S. Owens, T.V. Zenser, Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1963-1969.
- [6]. J.F. Gagne, V. Montminy, P. Belanger, K. Journault, G. Gaucher, C. Guillemette, Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), *Mol Pharmacol* 62 (2002) 608-617.
- [7]. Y. Ando, H. Saka, G. Asai, S. Sugiura, K. Shimokata, T. Kamataki, UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, *Ann Oncol* 9 (1998) 845-847.
- [8]. F. Innocenti, L. Iyer, M.J. Ratain, Pharmacogenetics of anticancer agents: lessons from amonafide and irinotecan, *Drug Metab Dispos* 29 (2001) 596-600.
- [9]. J.G. Slatter, L.J. Schaaf, J.P. Sams, K.L. Feenstra, M.G. Johnson, P.A. Bombardt, K.S. Cathcart, M.T. Verburg, L.K. Pearson, L.D. Compton, L.L. Miller, D.S. Baker, C.V. Pesheck, R.S. Lord, 3rd, Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients, *Drug Metab Dispos* 28 (2000) 423-433.
- [10]. E. Gupta, T.M. Lestingi, R. Mick, J. Ramirez, E.E. Vokes, M.J. Ratain, Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea, *Cancer Res* 54 (1994) 3723-3725.
- [11]. D.W. Nebert, M. Ingelman-Sundberg, A.K. Daly, Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues, *Drug Metab Rev* 31 (1999) 467-487.
- [12]. L. Iyer, C.D. King, P.F. Whittington, M.D. Green, S.K. Roy, T.R. Tephly, B.L. Coffman, M.J. Ratain, 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 Invest* 101 (1998) 847-854.
- [13]. F. Innocenti, S.D. Undevia, L. Iyer, P.X. Chen, S. Das, M. Kocherginsky, T. Karrison, L. Janisch, J. Ramirez, C.M. Rudin, E.E. Vokes, M.J. Ratain, Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan, *J Clin Oncol* 22 (2004) 1382-1388.



## CHAPITRE 3

- [14]. P.J. Bosma, J.R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B.A. Oostra, D. Lindhout, G.N. Tytgat, P.L. Jansen, R.P. Oude Elferink, et al., The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome, *N Engl J Med* 333 (1995) 1171-1175.
- [15]. L. Iyer, S. Das, L. Janisch, M. Wen, J. Ramirez, T. Karrison, G.F. Fleming, E.E. Vokes, R.L. Schilsky, M.J. Ratain, UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity, *Pharmacogenomics J* 2 (2002) 43-47.
- [16]. G. Monaghan, M. Ryan, R. Seddon, R. Hume, B. Burchell, Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome, *Lancet* 347 (1996) 578-581.
- [17]. E. Rouits, M. Boisdron-Celle, A. Dumont, O. Guerin, A. Morel, E. Gamelin, Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 5151-5159.
- [18]. A. Ruzzo, F. Graziano, F. Loupakis, D. Santini, V. Catalano, R. Bissoni, R. Ficarelli, A. Fontana, F. Andreoni, A. Falcone, E. Canestrari, G. Tonini, D. Mari, P. Lippe, F. Pizzagalli, G. Schiavon, P. Alessandroni, L. Giustini, P. Maltese, E. Testa, E.T. Menichetti, M. Magnani, Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy, *Pharmacogenomics J* 8 (2008) 278-288.
- [19]. G. Toffoli, E. Cecchin, G. Corona, A. Russo, A. Buonadonna, M. D'Andrea, L.M. Pasetto, S. Pessa, D. Errante, V. De Pangher, M. Giusto, M. Medici, F. Gaion, P. Sandri, E. Galligioni, S. Bonura, M. Boccalon, P. Biason, S. Frustaci, The role of UGT1A1\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol* 24 (2006) 3061-3068.
- [20]. A. Vogel, J. Ockenga, U. Ehmer, A. Barut, F.J. Kramer, R.H. Tukey, M.P. Manns, C.P. Strassburg, Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer, *Z Gastroenterol* 40 (2002) 497-502.
- [21]. S. Kaneda, J. Nalbantoglu, K. Takeishi, K. Shimizu, O. Gotoh, T. Seno, D. Ayusawa, Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene, *J Biol Chem* 265 (1990) 20277-20284.
- [22]. C. Guillemette, J.K. Ritter, D.J. Auyeung, F.K. Kessler, D.E. Housman, Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene, *Pharmacogenetics* 10 (2000) 629-644.
- [23]. L.E. Carlini, N.J. Meropol, J. Bever, M.L. Andria, T. Hill, P. Gold, A. Rogatko, H. Wang, R.L. Blanchard, UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan, *Clin Cancer Res* 11 (2005) 1226-1236.
- [24]. T.O. Lankisch, A. Vogel, S. Eilermann, A. Fiebeler, B. Krone, A. Barut, M.P. Manns, C.P. Strassburg, Identification and characterization of a functional TATA box polymorphism of the UDP glucuronosyltransferase 1A7 gene, *Mol Pharmacol* 67 (2005) 1732-1739.
- [25]. M. Ando, Y. Ando, Y. Sekido, K. Shimokata, Y. Hasegawa, Genetic polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase 1A7 gene and irinotecan toxicity in Japanese cancer patients, *Jpn J Cancer Res* 93 (2002) 591-597.
- [26]. E. Cecchin, F. Innocenti, M. D'Andrea, G. Corona, E. De Mattia, P. Biason, A. Buonadonna, G. Toffoli, Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the

## CHAPITRE 3

outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan, *J Clin Oncol* 27 (2009) 2457-2465.

[27]. E. Gamelin, R. Delva, J. Jacob, Y. Merrouche, J.L. Raoul, D. Pezet, E. Dorval, G. Piot, A. Morel, M. Boisdron-Celle, Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol* 26 (2008) 2099-2105.

[28]. O. Capitain, M. Boisdron-Celle, A.L. Poirier, S. Abadie-Lacourtoisie, A. Morel, E. Gamelin, The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer, *Pharmacogenomics J* 8 (2008) 256-267.

[29]. E. Beutler, T. Gelbart, A. Demina, Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 8170-8174.

[30]. L. Villeneuve, H. Girard, L.C. Fortier, J.F. Gagne, C. Guillemette, Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs, *J Pharmacol Exp Ther* 307 (2003) 117-128.

[31]. S. Kawabata, M. Oka, K. Shiozawa, K. Tsukamoto, K. Nakatomi, H. Soda, M. Fukuda, Y. Ikegami, K. Sugahara, Y. Yamada, S. Kamihira, L.A. Doyle, D.D. Ross, S. Kohno, Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 1216-1223.

[32]. M.C. Haaz, L. Rivory, C. Riche, L. Vernillet, J. Robert, Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions, *Cancer Res* 58 (1998) 468-472.

[33]. J.W. Lampe, J. Bigler, N.K. Horner, J.D. Potter, UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1\*28 and UGT1A6\*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations, *Pharmacogenetics* 9 (1999) 341-349.

**TABLES**

**Table I**      **Primer sequences and PCR conditions for UGT1A7 SNP analysis**

<b>Gene (Polymorphism)</b>	<b>Primer sequences 5' → 3'</b>
<b>UGT 1A7</b> (N129/131K)	(up) * TGGACGGCACCATTGCGA
	(down) CAAAATAAATGTTCCAAGTGC
	(seq) CCTTTAAGTATTCTACTAAT
<b>UGT 1A7</b> (W208R)	(up) * TGGACGGCACCATTGCGA C
	(down) CAAAATAAATGTTCCAAGTGC
	(seq) AAGTGCATGATGTGGTT

\* Biotinylated primer

**Table II: Patient characteristics at study inclusion**

<b>Characteristic</b>	<b>No. of patients (%)</b>	
		<b>(N=90)</b>
Age in years	Median (range)	64.5 (23 - 82)
Male / Female		62 (69%) / 28 (31%)
Primary tumor site	Colon	69 (77%)
	Rectum	21 (23%)
Metastatic sites	Liver	53 (59%)
	Lung	10 (11%)
	Peritoneal carcinomatosis	6 (7%)
	Lymph nodes	2 (2%)
	Locoregional disease	3 (3%)
	No. of patients with >1 site	16 (18%)
Performance Status (WHO)	0-1	86 (96%)
	2-3	4 (4%)
Treatment regimens	FOLFIRI	85 (94%)
	FOLFIRI + pemetrexed	1 (1%)
	FOLFIRI (weekly)	4 (4%)

**Table III: Distribution of UGT1A1 and UGT1A7 polymorphisms**

Polymorphism		Allele frequencies (%)		
Gene	AA substituted/position	WT (%)	Het (%)	Var (%)
<b>UGT1A1*28</b>		37 (41%)	41 (46%) *	12 (13%)
<b>UGT1A7</b>	N129/131K	37 (41%)	43 (48%)	10 (11%)
	W208R	33 (37%)	44 (49%)	13 (14%)

\* Includes two rare UGT1A1 genotypes; 5/7 and 5/6

AA: amino acid, Het: heterozygous, Var: homozygous mutated, WT: Homozygous wild-type

**Table 4: Distribution of UGT1A1 and UGT1A7 polymorphisms in the studied population**

	<b>No. (%) of patients with grade 1-2 (N=90)</b>	<b>No. (%) of patients with grade 3-4 (N=90)</b>
Asthenia	67 (74%)	7 (8%)
Neutropenia	45 (50%)	8 (9%)
Diarrhea	36 (40%)	5 (6%)
Nausea/Emesis	34 (38%)	
Anemia	24 (27%)	
Thrombocytopenia	13 (13%)	
Mucositis	11 (12%)	
Hand-foot syndrome	9 (10%)	
Conjunctivitis	6 (7%)	
Cardiac symptoms		1 (1%)

**Table V: Predictive factors for severe toxicity and diarrhea/neutropenia: univariate regression logistic analysis**

Factor	All grade 3-4 toxicity		Grade 3-4 diarrhea / neutropenia	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
<b>Age</b>		0.642		0.264
<75 years old	1		1	
≥75 years old	1.41 (0.33; 6.04)		2.70 (0.47; 15.46)	
<b>Performance Status (WHO)</b>		0.487		0.434
0-1	1		1	
2-3	0.44 (0.04; 4.42)		2.534 (0.24; 26.76)	
<b>UGT1A1*28</b>		0.087		<b>0.059</b>
6/6	1		1	
6/7	0.81 (0.23; 2.91)		0.37 (0.07; 2.02)	
7/7	3.93 (0.93; 16.58)		3.40 (0.74; 15.60)	
<b>UGT1A7 (N129/131K)</b>		0.142		<b>0.056</b>
G/G A/A A/A	1		1	
T/G C/A G/A	0.32 (0.09; 1.14)		0.10 (0.01; 0.87)	
T/T C/C G/G	1.33 (0.28; 6.26)		1.84 (0.38; 8.95)	
<b>UGT1A7 (W208R)</b>		<b>0.018</b>		<b>0.060</b>
T/T	1		1	
T/C	0.12 (0.03; 0.52)		2.49 (0.55; 11.31)	
C/C	0.26 (0.06; 1.06)		0.27 (0.05; 1.47)	

OR: Odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval

**Table VI: Predictive factors of response: univariate regression logistic analysis**

Gene (Polymorphism)	Genotype	Response	
		OR (95% CI)	p- value
UGT1A1*28	6/6	1	0.130
	6/7	1.51 (0.62; 3.70)	
	7/7	0.29 (0.06; 1.49)	
UGT1A7 (N129/131K)	G/G A/A A/A	1	0.144
	T/G C/A G/A	2.48 (0.98; 6.24)	
	T/T C/C G/G	2.36 (0.57; 9.84)	
UGT1A7 (W208R)	T/T	1	0.537
	T/C	0.47 (0.12; 1.84)	
	C/C	0.74 (0.30; 1.83)	

OR: Odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval



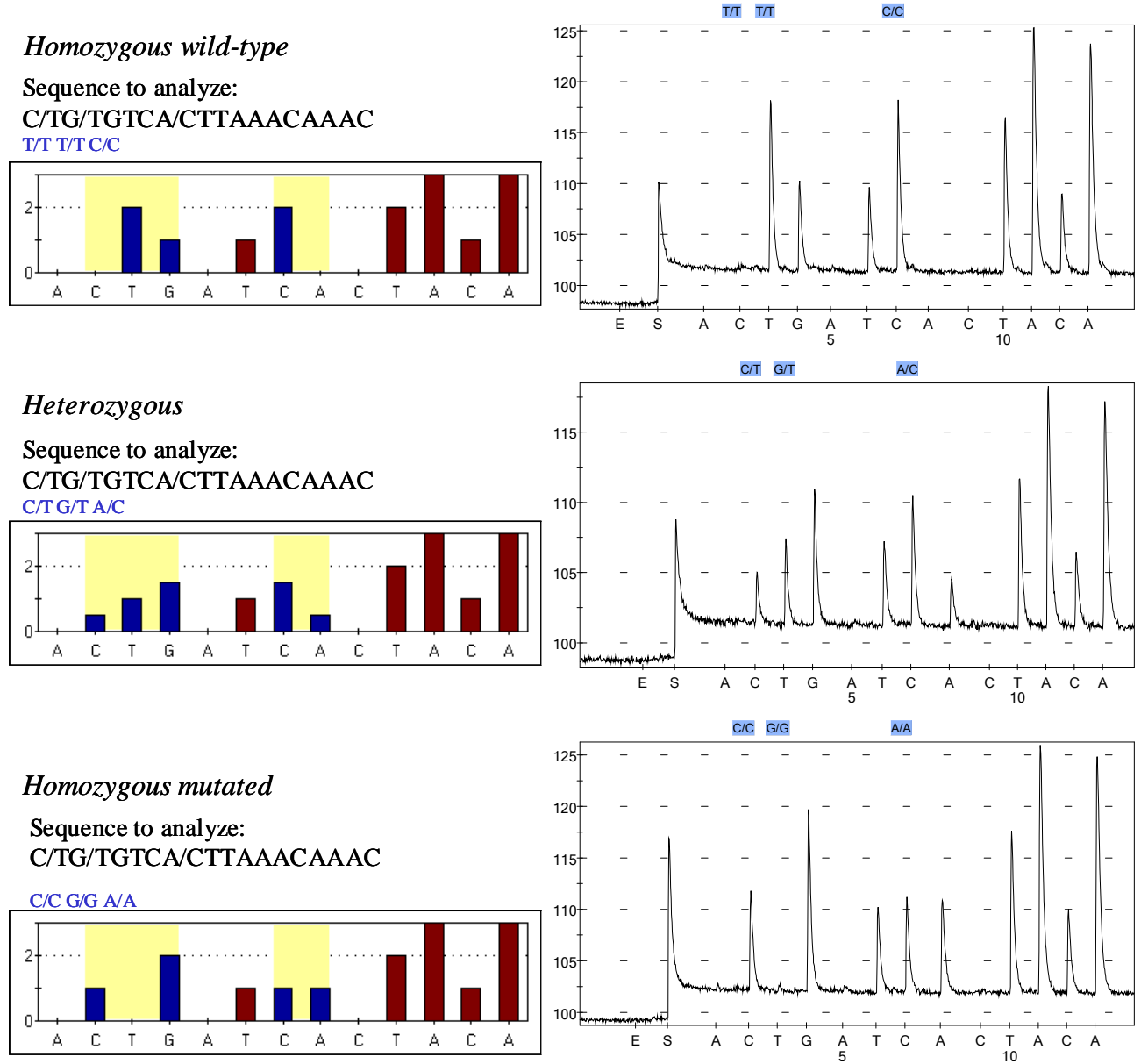
**Table VII: Predictive factors for overall and progression-free survival: univariate regression logistic analysis**

Gene (Polymorphism)	Overall Survival		Progression-Free Survival	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
UGT1A1*28		0.262		0.771
6/6	1		1	
6/7	0.734 (0.415; 1.299)		0.981 (0.612; 1.571)	
7/7	1.370 (0.640; 2.932)		1.666 (0.394; 7.045)	
UGT1A7 (N129/131K)		0.368		0.637
G/G A/A A/A	1		1	
T/G C/A G/A	0.675 (0.389; 1.171)		0.873 (0.550; 1.385)	
T/T C/C G/G	0.754 (0.310; 1.835)		0.711 (0.339; 1.491)	
UGT1A7 (W208R)		<b>0.009</b>		<b>0.004</b>
T/T	1		1	
T/C	0.793 (0.439; 1.432)		0.748 (0.463; 1.208)	
C/C	2.327 (1.131; 4.789)		2.229 (1.158; 4.565)	

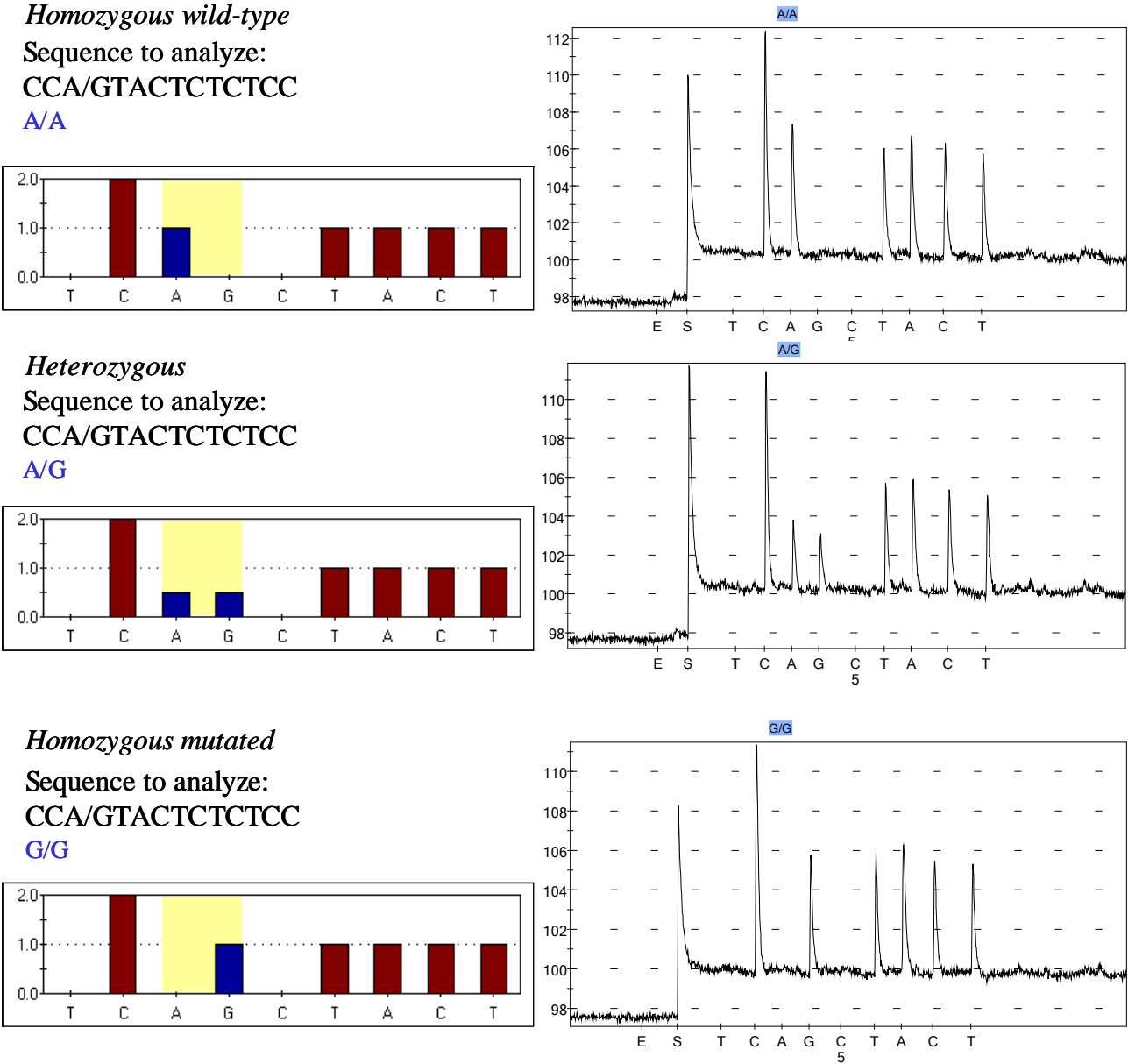
OR: Odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval

FIGURES

Figure 1: Representative histograms and pyrograms for the UGT1A7 N129K/K131R polymorphism



**Figure 2: Representative histograms and pyrograms for the UGT1A7 W208R polymorphism**



### **III.1.2. Identification des facteurs génétiques influençant la tolérance et l'efficacité de l'Oxaliplatine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques**

1. Présentation du travail
2. Résultats
3. Discussion
4. Publications 3 et 4

#### **III.1.2.1. Présentation du travail**

Selon la même démarche qu'avec le protocole FOLFIRI, en tenant compte de l'intérêt de la recherche des polymorphismes de la TS et de la MTHFR lors d'un traitement par 5-FU, ainsi que de l'adaptation pharmacocinétique, pharmacodynamique et pharmacogénétique, nous avons cherché à savoir si, au même titre que l'Irinotécan, l'Oxaliplatine « annulait » les effets délétères de certains polymorphismes retrouvés au niveau de ces enzymes du métabolisme cellulaire. Nous avons intégré dans notre recherche l'analyse de polymorphismes touchant certains gènes impliqués dans le métabolisme de l'Oxaliplatine. Ces polymorphismes pourraient expliquer au moins en partie les phénomènes de résistance à cette molécule, mais également la neurotoxicité dose-limitante et potentiellement très invalidante sur la qualité de vie des patients, très fréquemment rencontrée lors de son utilisation. Nous nous sommes donc intéressés à la Glutathion S-Transférase P1 (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. Plusieurs études translationnelles ont cherché à mettre en évidence des corrélations entre certains polymorphismes de ces gènes et les réponses ou non au traitement par Oxaliplatine [Stoelmacher *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2003]. Cependant les résultats sont souvent difficiles à interpréter rendant trop précoce leur utilisation en pratique courante. Le caractère contradictoire de ces études peut s'expliquer par plusieurs observations simples comme par exemple le fait que certaines de ces études portent sur l'ADN germlinal et d'autres sur l'ADN tumoral ce qui rend peu lisibles les résultats. Par ailleurs il y a les faibles effectifs utilisés dans ces études ce qui rend leurs interprétations souvent non statistiquement significatives. De plus il y a aussi le caractère très hétérogène des tumeurs explorées (estomac, ovaire, poumon, colon,...) et le fait que le système de réparation,

très complexe, fait intervenir de multiples partenaires. Ainsi, plutôt qu'un gène dont le polymorphisme serait déterminant, c'est un ensemble de coacteurs qu'il faudrait probablement prendre en considération.

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 les patients. Compte-tenu de la grande multiplicité des gènes et des polymorphismes étudiés dans le cadre de cette recherche de marqueurs génétiques prédictifs pour les toxicités et les réponses au traitement chimiothérapeutique de type FOLFOX4 (association 5-FU/acide folinique et Oxaliplatine), il nous a paru opportun de soumettre deux publications distinctes à partir cependant de la même base de données clinico-biologiques concernant une population homogène de patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique. La publication 3 associe également une autre voie de recherche translationnelle ouverte par les résultats d'une étude préliminaire [Gamelin *et al.*, 2007a] : l'éventuelle responsabilité dans la physiopathologie des neurotoxicités de l'oxalate, un des métabolites de l'Oxaliplatine, chélateur du calcium, le calcium lui-même est 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 III.1).

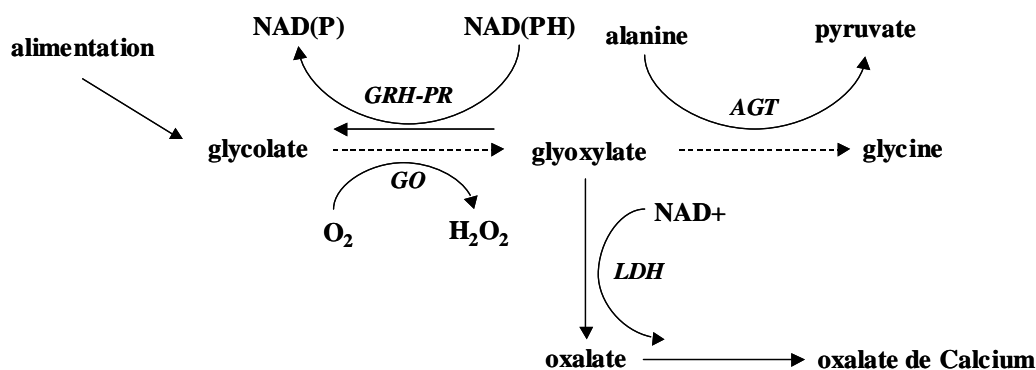


Fig. III.1. Métabolismes de l'oxalate et du glyoxylate

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 déshydrogénase (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, pourrât 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'éthylène glycol. Sa capacité à chélateur 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 [Gamelin *et al.*, 2007].

La publication 4 a également comme but la recherche de corrélation - sur le plan constitutionnel (à partir de leucocytes circulants), et non sur le plan tumoral (à partir des cellules tumorales) - entre les polymorphismes touchant des gènes de réparation de l'ADN et de toxicités, afin de permettre une sélection en pré-thérapeutique des patients à risque de mauvaise réponse à une chimiothérapie à base d'Oxaliplatine.

Comme dans le cas précédent, les résultats des publications 3 et 4 seront discutés ensemble puisqu'elles visent le même objectif, ont le même rationnel et se basent sur la même cohorte de patients.

### III.1.2.2. Résultats

Un total de 118 patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique, ont été étudiés sur une période allant de novembre 2000 en janvier 2007. Le suivi médian est de 1426 jours (3,9 ans), avec un intervalle compris entre 26,3 (2,2 ans) et 100,2 mois (8,3 ans).

Pour notre population, les caractéristiques cliniques ont été en accord avec les données épidémiologiques dans le cancer colorectal avancé : la moyenne d'âge de 65 ans avec des extrêmes entre 35 et 81 ans. 78% des patients était en bon état de santé à l'initiation du traitement avec un *performance status* < 2. La localisation de la tumeur primaire est principalement au niveau du côlon (63,5%). Au niveau du rectum cela représente 34,7%. La majorité des patients (68,6%) présentait un site métastatique unique, avec une localisation principalement hépatique (82,0%). 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 (**Table II, Publications 3 et 4**).

**La répartition des différents polymorphismes correspondait aux données de la littérature.** Ainsi, pour la TS comme pour la MTHFR elle est similaire avec les données décrites précédemment dans la population caucasienne [Keku *et al.*, 2002 ; Marcuello *et al.*, 2005 ; Marsh *et al.*, 1999 ; Etienne *et al.*, 2004 ; Cohen *et al.*, 2003] : 21,2% pour 2R/2R, 8,5% pour le génotype C/C de la mutation A1298C du MTHFR et 15,2% pour le génotype T/T de la mutation C677T du MTHFR. Les fréquences des polymorphismes d'ERCC1, XRCC1, XPD, AGXT et de GSTP concordent elles-aussi avec celles décrites chez les Caucasiens dans les études antérieures [Viguiet *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2003 ; Tibaldi *et al.*, 2008 ; Stoehlmacher *et al.*, 2001]. L'analyse du polymorphisme situé au codon 118 d'ERCC1 a montré que 16,1% et 37,3% des patients étaient porteurs des génotypes respectivement T/T et C/C, et que 46,6% étaient hétérozygotes (**Table IV, Publication 3 ; Table III Publication 4**).

Enfin, pour l'analyse en fonction de la tolérance et l'efficacité du protocole FOLFOX-4, les différentes sous-populations étudiées étaient homogènes entre elles à l'égard de l'âge ainsi que, de *performance status* et de l'état histologique. Ces populations homogènes ont permis de réaliser des analyses uni et multivariées, en évitant les préjugés liés à ces paramètres bien connus dans le cancer colorectal avancé et en se concentrant uniquement sur les paramètres génétiques.

**Concernant les toxicités**, un total de 386 événements toxiques tous grades confondus ont été observés. La plupart des événements toxiques sont de faible gravité (79,8%), catégorisé principalement comme étant des grades 1 et 2. Les toxicités de grade 3 ou 4 quelles qu'elles soient, ont été remarquées dans 38,14% des cas – se sont principalement des neutropénies et des neurotoxicités.

## CHAPITRE 3

Nous avons constaté également que les toxicités d'ordre digestif, comme les nausées, les vomissements et les diarrhées, restent relativement peu fréquentes : respectivement 5,08% et 8,8%.

Les toxicités hématologiques observées atteignent surtout les lignés érythrocytaires (33,9%), mais aussi les polynucléaires neutrophiles (36,4%) et les lignes plaquettaires (29,6%). Dans la population générale, 19,4% des patients ont présenté au moins une toxicité hématologique. L'asthénie reste un phénomène fréquent, présent dans 56,7% des cas.

Enfin et concernant les patients avec DPD mutée, 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.

La toxicité neurologique (spécifique à l'administration de l'Oxaliplatine) est un évènement rencontré chez la plupart des patients, tant sous forme faible (66,1%), mais également sous formes plus graves (24,5%).

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) (**Table V, Publication 3 ; Table IV Publication 4**).

En analyse multivariée, deux variables étaient significativement liées au risque de neurotoxicité : le statut C/T pour la mutation C118T d'ERCC1 apparaissait ainsi comme un facteur de risque de neurotoxicité avec un Odd Ratio (O.R.) à 2,86 (**Table VI, Publication 3**) ( $p = 0,013$  ; IC 95% 0,86 à 9,55) et un O.R. à 2,21 (ce ne sont pas les mêmes variables qui ont été étudiées d'où les différences) dans la **publication 4** ( $p = 0,025$  ; IC 95% 0,76 à 6,48) (**Table V**). Le statut C/C était protecteur par rapport aux deux autres génotypes dans la **publication 3**, en analyse univariée ( $p = 0,02$ ). Le génotype C/C pour A751C de XPD ( $n = 20$  patients (17% de la population)) apparaissait également comme prédictif pour la neurotoxicité avec un O.R. à 4,0 ( $p = 0,03$ , IC 95% 1,37 à 11,94). 50% de ces patients ( $n = 10$ ) ont présenté des neurotoxicités de grade 3 (**Table V, Publication 4**).

**Les études d'efficacité du traitement** retrouvaient un taux de réponse objective à 3 mois a été de 77,1% ( $n = 91$ ) et à 6 mois de 55,7% ( $n = 63$ ), avec un taux de réponse complète respectivement de 2,5% et 20,3% (**Table VII, Publication 3**). Ces taux sont bien supérieurs à



## CHAPITRE 3

ceux précédemment décrits dans la littérature et qui sont entre 48,3% et 53% [Simpson *et al.*, 2003 ; Grothey *et al.*, 2004].

Les chirurgies des métastases ont pu être secondairement réalisées dans 31,3% de cas, 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 et de 77% respectivement à 6 mois.

Les modèles d'analyse univariée et multivariée réalisés dans le but de l'identification des marqueurs génétiques corrélés avec la réponse objective à 3 ou à 6 mois, n'ont pas montré d'autres associations significatives entre les différents génotypes et ces paramètres cliniques ( $p > 0,05$ ).

**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.

En modèle univarié plusieurs facteurs génétiques ressortent comme étant significativement associés soit avec la survie globale, soit avec la survie sans progression, soit avec les deux types de survie. Ainsi, nous avons mis en évidence un impact significatif du polymorphisme Ala114Val (C341T) de GSTP1 sur la survie sans progression. Les patients porteurs d'un génotype hétérozygote ou homozygote muté ont un risque significativement plus augmenté de progresser par rapport aux patients avec un génotype C/C (O.R. = 1,740 IC 95% [1,049 ; 2,886] ;  $p = 0,0320$ ). Notons qu'en terme de durée de survie, les patients avec un génotype C/C ont une médiane de survie à 9,4 mois tandis que les patients présentant les génotypes C/T ou T/T de 7 mois ( $p = 0,0416$ ) en régression univariée selon le modèle de Cox.

Concernant les génotypes de la région 5'UTR de la TS, les survies sans progression et globale étaient statistiquement et paradoxalement plus courtes pour la population 2R/2R que 2R/3R ou 3R/3R ( $p = 0,013$  et  $0,015$  respectivement) (**Table VIII, Publication 3**).

Le polymorphisme Arg399Gln (C399T) de XRCC1 a été remarqué aussi comme facteur génétique associé significativement à la survie (que se soit à la survie globale ( $p = 0,0072$ ) ou à la survie sans progression ( $p = 0,0027$ )). La survie globale et la survie sans progression des patients avec un génotype C/C ou C/T ( $n = 74$  (62,7%) de la population générale) ont été statistiquement meilleures que pour le groupe de patients avec un génotype T/T (9,6 mois SSP et 24,6 mois SG vs 6,2 mois SSP et 13,1 mois SG ;  $p = 0,005$  pour la SSP et  $p = 0,01$  pour la SG). Ceci n'était pas retrouvé en analyse multivariée (**Table VII, Publication 4**).

En analyse multivariée et en excluant les patients opérés secondairement de leurs métastases, les groupes 2R/3R et 3R/3R pour la TS apparaissaient de nouveau avec un meilleur pronostic que la population 2R/2R ( $p = 0,02$  O.R. = 0,59 ; IC 95% [0,36 ; 0,94] et  $p = 0,006$  O.R. = 0,52 ; IC 95% [0,32 ; 0,83] respectivement) en contradiction avec les études précédemment publiées. De façon intéressante, les groupes C/T et T/T pour GSTP1 341 C>T avaient une plus mauvaise survie sans progression que la population C/C ( $p = 0,006$  O.R. = 2,07 ; IC 95% [1,22 ; 3,49]), et les patients homozygotes T/T pour la mutation C677T de la MTHFR une tendance à une meilleure survie globale ( $p = 0,056$  O.R. = 0,57 ; IC 95% [0,33 ; 1,01]). Finalement en considérant les variants à haut risque de progression, c'est à dire C/T ou T/T pour la mutation C341T de GSTP1 et 2R/2R pour la TS, nous avons combiné deux populations parmi les 118 patients de l'étude: soit sans aucun génotype à risque (group 0 composé de 78 patients (66,1%)), soit avec au moins un génotype à risque (group 1 composé de 40 patients (33,9%)). Les survies sans progression étaient de 9,6 et 7,1 mois respectivement et les survies globales de 25,6 et 18,6 mois. L'impact négatif pour les génotypes à risque sont visibles sur les courbes de Kaplan-Meier ( $p = 0,06$ ) (**Table VIIIbis, Publication 3**).

### III.1.2.3. Discussion

*Les résultats ressortant des deux études portant sur 118 patients témoignent une nouvelle fois l'intérêt de l'adaptation pharmacocinétique de doses de 5-FU, mais combinée ici à l'Oxaliplatine.* En effet, les taux de réponses au traitement selon le schéma FOLFOX4 adapté sont meilleurs par rapport aux données déjà publiées 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. De plus, le pronostic des patients a été amélioré suite à la possibilité de réalisation d'une chirurgie secondaire sur les métastases dans un tiers des cas. Ainsi, la survie globale médiane a été 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 environ de 20% de grade 3-4 ce qui est inférieur aux taux habituellement rapportés dans la littérature (pour les neutropénies : > à 48% et pour les toxicités neurologiques : 18% [Simpson *et al.*, 2003]). Concernant les patients présentant une mutation de la DPD, ils n'ont présenté aucune toxicité sévère car l'adaptation pharmacocinétique après diagnostic phéno- et génotypique pré-thérapeutique a été réalisée.

## CHAPITRE 3

Dans l'ensemble de la population générale, les toxicités rapportées étaient dans leur grande majorité de faible gravité. Cependant, chez un tiers des patients la survenue des thrombopénies et surtout d'une neurotoxicité (9 patients sur 10, 30% de l'ensemble des toxicités) a nécessité la diminution de dose de l'Oxaliplatine voire l'arrêt complet du traitement. En effet, pour l'Oxaliplatine, la toxicité neurologique est une toxicité limitante [Gamelin *et al.*, 2004 ; Ghirardi *et al.*, 2005]. La recherche de critères biologiques prédictifs et de traitements préventifs est donc particulièrement importante.

A ce sujet, nous avons mis en évidence dans nos deux études parallèles, deux polymorphismes étant liés à la survenue des événements neurotoxiques de grade 3-4 altérant la qualité de vie des patients. Il s'agit d'une part du génotype C/T (et dans une moindre mesure T/T) pour le polymorphisme C118T d'ERCC1 (**Publication 3**), et d'autre part du statut C/C pour le polymorphisme A751C de XPD(**Publication 4**).

L'Oxaliplatine présente deux types de toxicités sur le plan neurologique. La première « aiguë » survenant 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. Ce type de toxicité 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). Notre équipe et d'autres ont pu montrer *in vitro* comme *in vivo* chez les patients, l'implication de l'oxalate dans le type de toxicité aiguë, via les canaux sodiques voltage-dépendants, même si l'ensemble des mécanismes restent peu clair et la physiopathologie non univoque. Cette observation a permis à notre laboratoire de démontrer l'effet bénéfique d'une infusion de Calcium/Magnésium dans le management de la toxicité aiguë survenue lors de traitement par l'Oxaliplatine. Cette pratique est actuellement introduite, reconnue et utilisée.

La seconde type de toxicité est la « toxicité chronique » caractérisée par une perte de sensibilité et par des atteintes fonctionnelles et motrices après un temps variable d'exposition à l'Oxaliplatine. Ce type de toxicité se manifeste par des atteintes des gestes fins de la vie quotidienne tels que l'écriture, le boutonnage, le laçage grevant très clairement la qualité de vie des patients. La toxicité chronique est potentiellement sévère (assez souvent de grade 3-4), 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.

De plus, 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. Ceux-ci étant situés hors du système nerveux central, en périphérie, ils ne sont pas « protégés » par la barrière méningée ou hémato-encéphalique et donc ni par ses systèmes de détoxification spécifique (protéines d'efflux comme ABCC2 par exemple) [Cavaletti *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 1999].

Les résultats ressortant de nos études appuient ces observations car nous avons individualisé deux protéines majeures du système de réparation par NER – ERCC1 et XPD - comme ayant un impact significatif sur l'apparition des neurotoxicités de grade 3-4. **A notre connaissance, nos études sont les premières montrant une corrélation des protéines de réparation de l'ADN avec les neurotoxicités induites par l'Oxaliplatine.**

Les polymorphismes touchant des gènes de réparation de l'ADN ont été signalées comme ayant un effet sur la survie sans progression et sur l'apparition des toxicités suite un traitement à base de sels de platine dans différents types de cancer [Suk *et al.*, 2005 ; Marsh *et al.*, 2007 ; Stoehlmacher *et al.*, 2004 ; Stoehlmacher *et al.*, 2001 ; Shirota *et al.*, 2001 ; Ruzzo *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2003]. Cependant, aucun élément de corrélation statistique entre ces gènes et les neurotoxicités n'a pas été retrouvé.

Par ailleurs l'élimination des dérivés du platine se fait après conjugaison à la méthionine, la cystéine ou le glutathion. L'une des voies majeures impliquées est la voie du glutathion. Les enzymes de la super-famille glutathion S-transférases (GST) catalysent la conjugaison entre le glutathion réduit et des xénobiotiques électrophiles. Elles permettent ainsi la détoxification de nombreux agents, dont les dérivés du platine, empêchant l'induction de dommages de l'ADN [Strange *et al.*, 1999] et réduisant ainsi l'effet thérapeutique.

Une étude relativement récente [Lecomte *et al.*, 2006] s'est intéressée à l'association entre les différents polymorphismes de la GST et la survenue de la neurotoxicité chez les patients recevant une chimiothérapie à base de l'Oxaliplatine. Les résultats obtenus ont mis en évidence que les patients présentant un génotype homozygote muté pour le SNP A313G (Ile105Val) de GSTP1 ont manifesté plus de risques d'apparition de neurotoxicité de grade 3 par rapport aux autres patients. Par conséquent l'allèle 105Val de GSTP1 serait un facteur génétique au rôle protecteur contre les toxicités neurologiques graves. Il a été montré que le changement de l'Ile105 par Val semble associé à une altération de l'activité catalytique de l'enzyme [Watson *et al.*, 1998], ceci pouvant expliquer les résultats trouvés par Lecomte et son équipe.

De plus, précédents travaux de notre laboratoire ont mis en évidence l'association entre les polymorphismes d'AGXT et les toxicités chroniques et aiguës survenues après traitement avec de l'Oxaliplatine [Gamelin *et al.*, 2007]. Cependant, dans nos études nous n'avons pu

## CHAPITRE 3

retrouver d'interaction ni entre les polymorphismes de GSTP1 ni entre ceux d'AGXT et l'incidence de toxicités neurologique sévères à l'Oxaliplatine.

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 faisant intervenir le glutathion (et donc les polymorphismes de GSTP1). Compte tenu de cette observation, nous pouvons suggérer que le principal mécanisme impliqué dans la neurotoxicité chronique soit lié à une toxicité par altération de l'ADN des neurones périphériques, toxicité encore favorisée par des systèmes de réparation « défaillants » face à une agression massive par la chimiothérapie « Oxaliplatine », sans être pour autant délétère pendant la vie de l'individu en condition normale d'homéostasie cellulaire. Ces anomalies induites sur l'ADN par l'Oxaliplatine pourraient aboutir à des mécanismes de stress cellulaire sur les neurones périphériques sensitifs ayant comme résultat une perturbation de leurs fonctions dans les messages neuroceptifs envoyés vers le système nerveux central via les cornes postérieures médullaires. Les variants mutés pour les mutations C118T d'ERCC1 et A751C de XPD ont été associé à une diminution de l'activité enzymatique de chacune de ces protéines et donc une diminution de la capacité de réparation de l'ADN [Duell *et al.*, 2000]. Cette diminution de la capacité de réparation peut impliquer les manifestations neurotoxiques observées sous traitement à long terme et surtout leurs faibles réversibilités si ces lésions sont définitives. Cette hypothèse est en partie corrélée à l'observation d'une meilleure survie sans progression (**Table VIII, Publication 3 ; Table VII, Publication 4**) pour la population C/C ou C/T par rapport à la population T/T d'ERCC1 118C>T (10,1 mois vs 8,0 mois, tendant à la significativité ( $p = 0,068$ )). Cette observation pourrait s'expliquer par une toxicité neuronale accrue de l'Oxaliplatine sur les cellules cancéreuses due aux même mécanismes de réparation de l'ADN que ceux retrouvés possiblement au niveau des ADN neuronaux « sains » des ganglions spinaux. Par ailleurs, les patients avec un génotype T/T semblent tirer plus de bénéfices suite à ce protocole chimiothérapeutique car ils présentent des réponses objectives - (RC + RP) selon les critères RECIST- étant considérés de « bons répondeurs » après 6 mois de traitement : C/C 15%, C/T 38% et T/T 46%. Des résultats semblables ont été indiqués par Viguiet et ses collaborateurs. Ils ont constaté que les taux de réponse au traitement (protocole chimiothérapeutique utilisant l'association 5-FU/Oxaliplatine) des patients homozygotes T/T étaient significativement meilleurs que ceux des patients hétérozygotes ou homozygotes C/C (respectivement 61,9%, 42,3% et 21,4%,  $p = 0,018$ ) [Viguiet *et al.*, 2005]. Ce polymorphisme

d'ERCC1 apparaît donc comme un facteur prédictif valide de la chimiosensibilité des cancers colorectaux à l'Oxaliplatine dans une association avec le 5-FU.

Il a été montré que chez les patients atteints d'un cancer colorectal avancé et traités par l'association 5-FU et Oxaliplatine, en deuxième et troisième ligne après échec du 5-FU ou de l'Irinotécan, le polymorphisme A751C du gène XPD est un facteur prédictif pour la survie. Ainsi les patients présentant un génotype homozygote sauvage A/A ont eu aussi une meilleure réponse au traitement par rapport aux autres (24% vs 10% pour les hétérozygotes et 10% pour les homozygotes C/C,  $p = 0,015$ ). Cette différence significative a été retrouvée aussi au niveau de la survie globale, les patients présentant un génotype A/A ayant aussi une meilleure survie globale, avec une médiane 6 fois supérieure à celle des patients présentant un génotype muté C/C ( $p = 0,002$  ; 17,4 mois (IC 95% [7,9 ; 26,5]) vs 3,3 mois (IC 95% [1,4 ; 6,5]) [Park *et al.*, 2001 ; Stoehlmacher *et al.*, 2004].

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

Dans notre étude nous avons remarqué le bénéfice théorique de mutations de la MTHFR sur la survie globale de group de patients avec un génotype T/T (associé à une diminution enzymatique d'environ 75%), avec et après une première ligne de traitement par FOLFOX4 adapté. Notons donc que pour ce génotype il y a une tendance très proche de la significativité ( $p = 0,056$  ; O.R. = 0,57, IC 95% [0,33 ; 1,01]). Ces résultats sont aussi en accord avec d'autres de la littérature [Stoehlmacher *et al.*, 2004 ; Cohen *et al.*, 2003]. Concernant le polymorphisme de la TS, la population 2R/2R semblent être à risque de survies moindres par rapport aux populations 2R/3R et 3R/3R.

Par ailleurs, ce résultat paraît très surprenant et en contradiction avec les observations ressortant d'autres études [Popat *et al.*, 2004]. En tout cas, un tel résultat confirme la difficulté d'interprétation, au moins sur le plan de l'ADN génomique, d'un tel génotypage sur le devenir prévisionnel clinique des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques. Après plus de 10 ans d'exploration la TS 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

## CHAPITRE 3

majeure dans la compréhension des phénomènes pharmacogénétiques [Goekkurt *et al.*, 2006 ; Jakobsen *et al.*, 2005].

En conclusion, un schéma FOLFOX4 adapté à la pharmacogénétique montre un haut niveau d'efficacité (taux de réponse objective à 3 mois de 77,1% et à 6 mois de 55,7%) tout en étant associé à un taux de toxicité tout à fait acceptable (38,14% grades 3 - 4).

Dans nos études nous avons également montré que la toxicité chronique de l'Oxaliplatine peut être liée à des altérations génétiques, potentiellement irréversibles, dose-dépendantes, dues à la formation d'adduits sur l'ADN notamment au niveau des neurones sensitifs périphériques des ganglions spinaux. Les neurones sensitifs périphériques des ganglions spinaux sont particulièrement exposés et ne bénéficient pas de la protection de la barrière méningée et de ses systèmes efficaces d'efflux des xénobiotiques agressifs. Les groupes de patients présentant des génotypes homozygotes C/C (16,1%) pour C118T d'ERCC1 et A/A (45,7%) pour A751C d'XPD semblent avoir un profil pharmacogénétique favorable concernant ce type de toxicité et pourraient éventuellement bénéficier d'une intensification de doses d'Oxaliplatine. Par ailleurs, le bénéfice et la tolérance d'une telle intensification thérapeutique seront à démontrer dans le cadre d'études prospectives. Au contraire, le génotype T/T pour la mutation C118T d'ERCC1 semble à risque accru de toxicité neurologique, mais paraît tirer bénéfice en terme de réponses objectives et de survie, de cette sensibilité à l'Oxaliplatine.

**III.1.2.4. Publication 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. (*Soumis à publication*)**

Capitain, Olivier (MD).<sup>1,2</sup>, Asevoaia, Andreea<sup>1</sup>, Poirier, Anne Lise.<sup>3</sup>, Boisdron-Celle, Michèle (PharmaD-PhD)<sup>1</sup>, Morel, Alain (PhD)<sup>1</sup>, Gamelin, Erick (MD-PhD)<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U892

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology and Clinical Pharmacology,

<sup>3</sup>Department 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 U892

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, (TS); dehydropyrimidine dehydrogenase, (DPD); Methylene Tetra-Hydro-Folate Reductase, (MTHFR); Glyoxylate Amino-Transferase, (AGXT); Glutathione S-Transferase  $\pi$  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 (DPD), Thymidylate Synthase (TS) and Methylene Tetra-Hydro-Folate Reductase (MTHFR) -, in oxalate metabolism - Glyoxylate Amino-Transferase (AGXT) -, in detoxification glutathione cycle - Glutathione S-Transferase  $\pi$  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 DPD 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 multivariate analysis ( $p=.013$ ). 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 TS 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 (TS)*, 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 12<sup>th</sup> 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 TS 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 (DPD)*, 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 TS (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 TS 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<sup>+</sup>/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  $\pi$  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

## CHAPITRE 3

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 1)* 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 (*TS*, *DPD*, *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/m<sup>2</sup>. 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/m<sup>2</sup> of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m<sup>2</sup> of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m<sup>2</sup> 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

## CHAPITRE 3

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 TS, DPD, 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

## CHAPITRE 3

contained: 50µl of reaction mix consisted of 1X PCR Buffer (pH 8.5), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 which 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 TS 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 DPD polymorphisms, four SNPs, associated with severe DPD 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 TS, 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 12<sup>th</sup> 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



## CHAPITRE 3

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  $\alpha$  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***Clinical data and genotype frequencies*

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 intravenous 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 TS, DPD and MTHFR (**28-33; 56-60**): 21.2% for 2R/2R, 8.5% for MTHFR 1298C/C, 15.2% for MTHFR 677T/T, 3.4% for DPD polymorphism heterozygotes (i.e. two A/T for DPD2846 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 TS, 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 TS 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 TS 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).

## CHAPITRE 3

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 TS, 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 DPD 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 (TS, DPD, MTHFR, ERCC1, GSTP1 and AGXT) analyzed for potential statistical correlation.

Concerning efficacy and safety of tailored (i.e. after pre-therapeutic DPD 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 TS 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 TS 2R/2R population were statistically shorter than 2R/3R or 3R/3R populations (p=.006 and .029 respectively). However the clinical influence of TS polymorphisms in 5-FU based chemotherapy are often controversial because of the



diversity of used treatments, clinical settings, complex mechanisms of TS regulation and mainly because of TS 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 TS status as prognostic or resistance factor. For all these reasons, TS 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 TS 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 TS. 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 TS 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 TS 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, 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. *Clin Cancer Res* 2003; 63:2898-2904.

25. 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.
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. Papat 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, Ruskiewicz 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, Gastiburu 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 Cancer 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, Boisdron-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, Boisdrón-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., Boisdrón-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, Ehninger 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, Figer 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, Kretzschmar 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)
<b>MTHFR</b> Ala226Val (677C>T)	(up) TATTGGCAGGTTACCCCAA (down)Biot CTCACCTGGATGGGAAAGAT (seq) AGAAGGTGTCTGCGG	57.0
<b>MTHFR</b> 1298A>C	(up) GCCAGGGGCAATTCCTCTT (down)BiotCTTTGTGACCATTCCGGTTT (seq) GGAGCTGACCAGTGAAG	57.0
<b>GSTP1</b> Ile105Val (313A>G)	(up) GGACCTCCGCTGCAAATAC (down)BiotGGCACAAGAAGCCCCTTT (seq) ACCTCCGCTGCAAAT	56.0
<b>GSTP1</b> Ala114Val (341C>T)	(up) GGATGATACATGGTGGTGTCTG (down)BiotGGACAGCAGGGTCTCAAAAG (seq) GTGTCTGGCAGGAGG	56.0
<b>ERCC1</b> Asn118Asn (118C>T)	(up) TGTGGTTATCAAGGGTCATCC (down)BiotCCAGCACATAGTCGGGAATTA (seq) ACTGAAGTTCGTGCG	58.0
<b>ERCC1</b> 3'UTR (8092C>A)	(up) CCGGGGGCAGACTACACA (down)BiotAGAGACAGTGCCCCAAGAGG (seq) GGACAAGAAGCGGAA	58.0

**Table I (bis). Characteristics of the studied polymorphisms with primer sequences**

<b>Gene (Site)</b>	<b>Primer sequences 5' → 3'</b>	<b>Anneling Tm (°C)</b>
<b>DPD</b> IVS14+1G> A	(up) atcagtgagaaaacggctgc	58.0
	(down) <b>Biot</b> -taaacattcaccaacttatgcca	
	(seq) aggctgactttccaga	
<b>DPD</b> 464T>A	(up) ttatggagctgctaagatga	58.0
	(down) <b>Biot</b> -atcacatacactcagtagcaaa	
	(seq) cccattaatattggt	
<b>DPD</b> 1679T>G	(up) aatatggagcttccgttct	58.0
	(down) <b>Biot</b> -gagagaaagtttggtagg	
	(seq) ccagccaccagcacatcaa	
<b>DPD</b> 2846A>T	(up) aagcactgcagtaccttgaa	58.0
	(down) <b>Biot</b> -tcatgtagcatttaccacagttga	
	(seq) gcaagttgtggctatga	
<b>AGXT</b> Pro11Leu (154C>T)	(up) CACCAATCCTCACCTCTCAC	58.0
	(down) <b>Biot</b> -TCCTTGCTCATGGACCCG	
	(seq) AL +TGC+TGG+TGACCCC	
<b>AGXT</b> Ile340Met (1142A>G)	(up) TCTCACCCACGCACTGAG	58.0
	(down) <b>Biot</b> -GTTTGGTTTCTGCAAAGG	
	(seq)CATCGTCAGCTACGTCA	
<b>TS</b> 5'UTR	(up) GTCCTGCCACCGCGCCACTT	55.0
	(down) GAGCCGGCCACAGGCATGG	

**Table II. Patients and tumor' initial characteristics**

Clinical data	Number (%)
<b>Gender</b>	
Male	70 (59.3)
Female	48 (40.7)
<b>PS</b>	
0-1	92 (78.0)
2-3	26 (22.0)
<b>Median age (years)</b>	65.0
<b>Range (years)</b>	35-81
<b>Tumor histology</b>	
Lieberkuhnian	105 (89.0)
Mucinous	13 (11.0)
<b>Initial ACE levels</b> Normal	35 (29.7)
> 3 UI/mL	83 (70.3)
<b>Tumor site</b>	
Colon	77 (65.3)
Rectum	41 (34.7)
<b>Metastatic site</b>	
<b>Number of sites</b> = 1	81 (68.6)
= 2	30 (25.4)
≥ 3	7 (6.0)
<b>Synchronous Metastasis</b>	109 (92.4)
<b>If unique site: Location</b>	
Liver	66 (81.5)
Lung	11 (13.6)
<b>Peritoneal Carcinomatosis or nodes</b>	4 (4.9)



**Table III. Distribution of the successive lines in the whole population**

	<b>Line 2</b>	<b>Line 3</b>	<b>Line 4</b>	
<b>Number of treated patients and percentage according to initial population (%)</b>	<b>99 (83.9%)</b>	<b>48 (40.7%)</b>	<b>18 (15.3%)</b>	
<b>Type of chemotherapy</b>				<b>(N) Total (%)</b>
<b>FOLFIRI</b>	58	3	0	<b>61 (51.47%)</b>
<b>FOLFOX</b>	0	9	4	<b>13 (11.0%)</b>
<b>Targeted-therapy Regimens</b>	27	29	6	<b>62 (52.5%)</b>
<b>Intra-venous 5-FU (FUFOL or LV5VU2 Regimen)</b>	8	2	4	<b>14 (11.9%)</b>
<b>Per os 5-FU prodrugs (CAPECITABINE)</b>	6	5	4	<b>15 (12.7%)</b>

Table IV. *Distribution of studied polymorphisms*

		Nb of patients	Frequency (%)
<b>MTHFR 677C&gt;T</b>	C/C	42	35.6
	C/T	58	49.1
	T/T	18	15.2
<b>MTHFR 1298A&gt;C</b>	A/A	63	53.4
	A/C	45	38.1
	C/C	10	8.5
<b>GSTP1 313 A&gt; G</b>	A/A	55	46.6
	A/G	50	42.4
	G/G	13	5.0
<b>GSTP1 341C&gt;T</b>	C/C	99	83.9
	C/T	17	14.4
	T/T	2	1.7
<b>ERCC1 118C&gt;T</b>	C/C	19	16.1
	C/T	55	46.6
	T/T	44	37.3
<b>ERCC1 8092C&gt;A</b>	C/C	69	58.5
	C/A	40	33.9
	A/A	9	7.6
<b>DPD</b>	2846 A>T - A/T	2	1.7
	464 T>A - T/A	2	1.7
<b>AGXT 154C&gt;T</b>	C/C	66	56.0
	C/T	47	39.8
	T/T	5	4.2
<b>AGXT 1142A&gt;G</b>	A/A	62	52.5
	A/G	50	42.4
	G/G	6	5.1
<b>TS (5'UTR)</b>	2R/2R	25	21.2
	2R/3R	58	49.1
	3R/3R	35	29.7

**Table V. Distribution of the toxic side-effects under tailored FOLFOX-4 regimen**

	<b>Grade 1</b>	<b>Grade 2</b>	<b>Grade 3</b>	<b>Grade 4</b>	<b>Total (n)</b>
<b>Neuropathy</b>	56	22	29	0	<b>107</b>
<b>Mucositis</b>	12	2	3	0	<b>17</b>
<b>Conjunctival effects</b>	9	2	0	0	<b>11</b>
<b>Diarrhoea</b>	2	1	0	0	<b>3</b>
<b>Hand-foot syndrome</b>	9	5	0	0	<b>14</b>
<b>Cardiac effects</b>	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Neutropaenia</b>	3	4	31	5	<b>43</b>
<b>Thrombopaenia</b>	9	22	3	1	<b>35</b>
<b>Anaemia</b>	30	9	1	0	<b>40</b>
<b>Nausea</b>	21	6	0	0	<b>27</b>
<b>Alopecia</b>	18	4	0	0	<b>22</b>
<b>Asthaenia</b>	49	13	5	0	<b>67</b>
<b>Total (n)</b>	<b>218</b>	<b>90</b>	<b>72</b>	<b>6</b>	<b>386</b>

**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
<b>AGXT</b>		0.5631		
C/C	1			
C/T	0.556 [0.087; 3.546]			
T/T	0.414 [0.063; 2.721]			
<b>AGXT</b>		0.9205		
A/A	1			
A/G	0.722 [0.135; 3.867]			
G/G	0.786 [0.144; 4.279]			
<b>ERCC1</b>		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]	
<b>ERCC1</b>		0.3553		
A/A	1			
A/C	0.370 [0.081; 1.692]			
C/C	0.341 [0.079; 1.480]			
<b>GSTP1</b>		0.1638		
C/C	1			
C/T + T/T	2.028 [0.750; 5.487]			
<b>GSTP1</b>		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]	
<b>MTHFR</b>		0.2974		
C/C	1			
C/T	0.597 [0.268; 1.332]			
T/T	0.455 [0.144; 1.438]			
<b>MTHFR</b>		0.9181		
A/A	1			
A/C	0.703 [0.185; 2.676]			
C/C	0.800 [0.203; 3.155]			
<b>TS</b>		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**

	<b>Nb of patients (%) at 3 months</b>	<b>Nb of patients (%) at 6 months</b>
<b>Complete Response (CR)</b>	3 (2.5)	23 (20.3)
<b>Partial Response (PR)</b>	88 (74.5)	40 (35.4)
<b>Overall Response (OR) = CR + PR</b>	91 (77.1)	63 (55.7)
<b>Disease Control</b>	104 (88.1)	87 (77.0)
<b>Disease Progression</b>	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.**

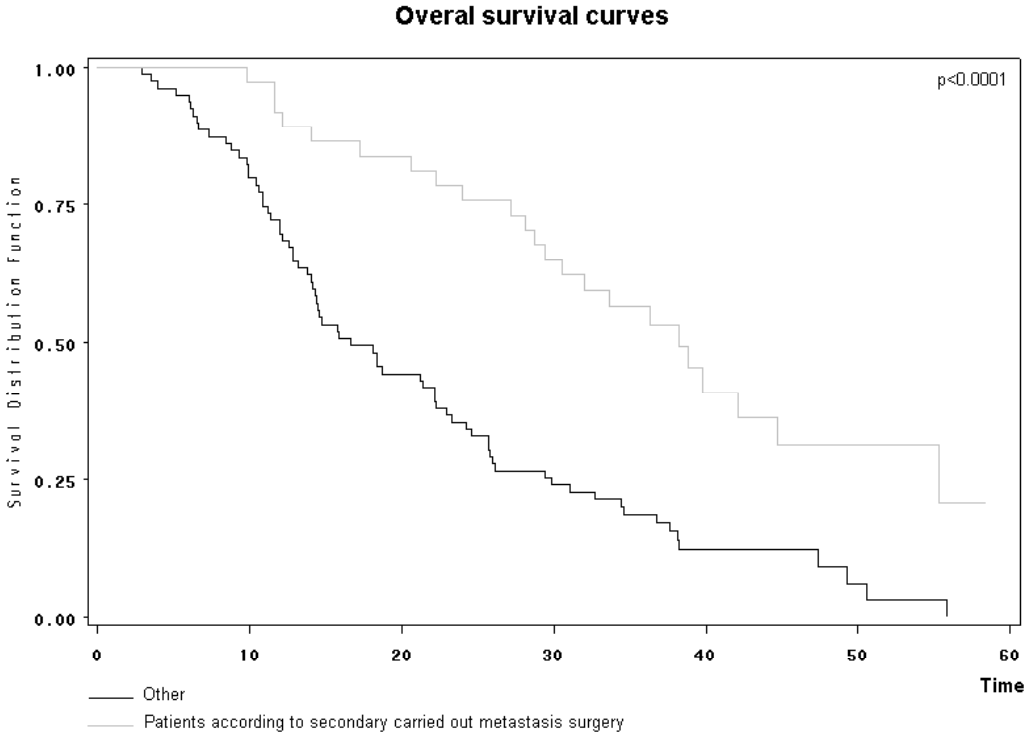
Univariate	Overall Survival		P	Progression-free Survival		p
		OR [IC 95%]			OR [IC 95%]	
Age	≤60 years	1	0.7247	1	0.8636	
	>60 - ≤70 years	0.893 [0.547 ; 1.458]		0.894 [0.568 ; 1.405]		
	>70 years	1.102 [0.676 ; 1.794]		0.994 [0.628 ; 1.573]		
Gender	Man	1	<b>0.0206</b>	1	0.1876	
	Woman	1.630 [1.078 ; 2.465]		1.292 [0.883 ; 1.891]		
Number of metastatic sites	≤ 1	1	0.4575	1	0.2064	
	>1	1.183 [0.760 ; 1.840]		1.301 [0.865 ; 1.958]		
Performance status	0-1	1	0.1407	1	<b>0.0459</b>	
	2-3	1.433 [0.888 ; 2.311]		1.588 [0.865 ; 1.958]		
Resecability	No	1	<b>&lt;0.0001</b>	1	<b>&lt;0.0001</b>	
	Yes	0.345 [0.214 ; 0.556]		0.267 [0.166 ; 0.430]		
AGXT*	C/C	1	0.4884	1	0.8115	
	C/T	1,230 [0,809 ; 1,869]		0,895 [0,606 ; 1,323]		
	T/T	1,570 [0,569 ; 4,370]		0,818 [0,325 ; 2,057]		
AGXT1*	A/A	1	0.8376	1	0.3308	
	A/G	1,096 [0,724 ; 1,659]		0,921 [0,627 ; 1,353]		
	G/G	0,846 [0,305 ; 2,352]		0,492 [0,192 ; 1,260]		
ERCC1*	C/C	1	0.5661	1	0.1139	
	C/T	1,146 [0,638 ; 2,059]		1,298 [0,758 ; 2,224]		
	T/T	0,901 [0,490 ; 1,656]		0,837 [0,480 ; 1,460]		
ERCC1*	C/C + C/T	1	0.3391	1	0.0684	
	T/T	0,815 [0,535 ; 1,240]		0,695 [0,470 ; 1,028]		
ERCC1*	A/A	1	0.8600	1	0.9866	
	A/C	0,804 [0,369 ; 1,751]		1,046 [0,504 ; 2,170]		
	C/C	0,835 [0,396 ; 1,759]		1,014 [0,503 ; 2,045]		
GSTP1*	C/C	1	0.6910	1	0.0997	
	C/T	1,076 [0,618 ; 1,873]		1,727 [1,018 ; 2,929]		
	T/T	1,825 [0,445 ; 7,484]		1,829 [0,453 ; 7,625]		
GSTP1*	C/C	1	0.6490	1	<b>0.0320</b>	
	C/T + T/T	1,130 [0,667 ; 1,917]		1,740 [1,049 ; 2,886]		
GSTP1*	A/A	1	0.8594	1	0.5342	
	A/G	0,937 [0,607 ; 1,447]		1,046 [0,703 ; 1,556]		
	G/G	1,128 [0,580 ; 2,192]		1,421 [0,765 ; 2,638]		
MTHFR*	C/C	1	0.0925	1	0.2109	
	C/T	1,133 [0,724 ; 1,774]		1,193 [0,790 ; 1,799]		
	T/T	0,587 [0,313 ; 1,101]		0,732 [0,414 ; 1,296]		
MTHFR*	C/C + C/T	1	<b>0.0354</b>	1	0.1240	
	T/T	0,545 [0,310 ; 0,959]		0,665 [0,395 ; 1,119]		
MTHFR*	A/A	1	0.6747	1	0.2554	
	A/C	1,192 [0,774 ; 1,835]		1,236 [0,831 ; 1,838]		
	C/C	0,929 [0,440 ; 1,960]		0,698 [0,345 ; 1,412]		
TS*	2R	1	<b>0.0147</b>	1	<b>0.0136</b>	
	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	<b>0.0153</b>	1	<b>0.0135</b>	
	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.**

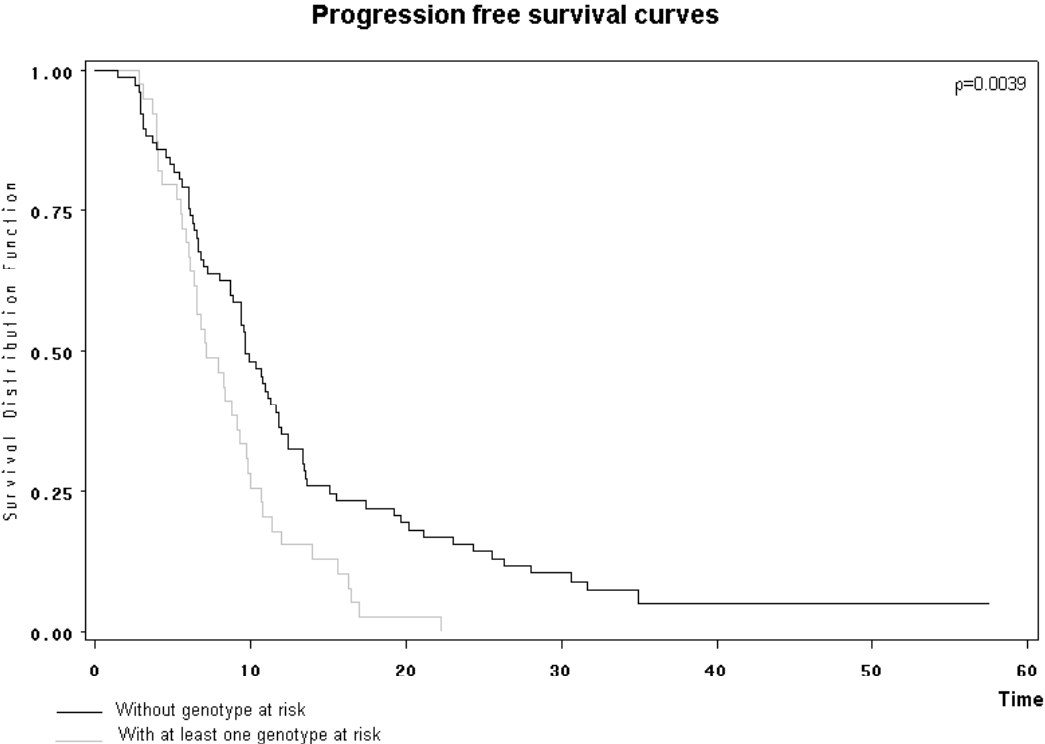
Univariate	Overall Survival		Progression-free Survival	
	OR [IC 95%]	p	OR [IC 95%]	p
<b>MTHFR</b>				
CC+CT	1	0,0560	1	0,0871
TT	0,575 [0,326; 1,014]		0,631 [0,373; 1,069]	
<b>TS</b>				
2R	1	0,0287	1	0,0063
2R/3R + 3R	0,588 [0,365; 0,946]		0,520 [0,325; 0,831]	
<b>GSTP1</b>				
CC			1	0,0064
CT+TT			2,070 [1,227; 3,494]	

FIGURES

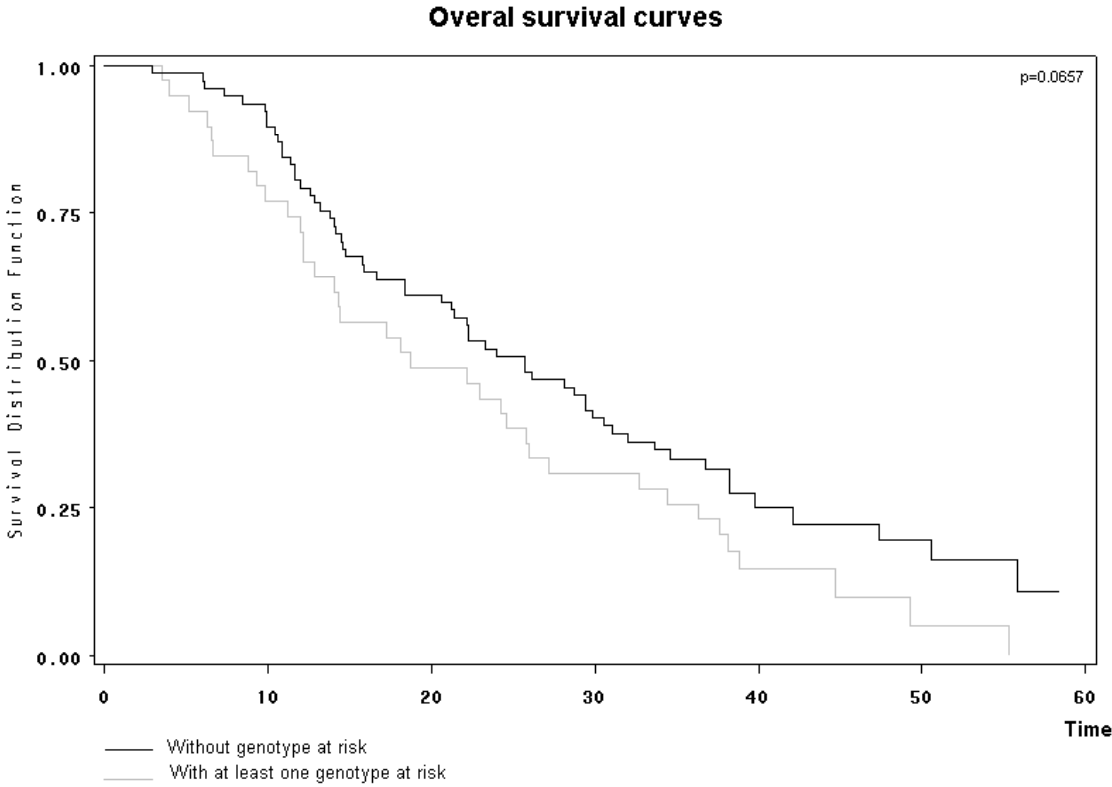


**Figure 1.** *Univariate Cox regression model for overall survival of patients according to secondary carried out metastasis surgery.*





**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.

**III.1.2.5. Publication 4**

**A MULTIVARIATE ANALYSIS OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR GENE  
POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER  
AND TREATED WITH FIRST LINE FOLFOX 4 CHEMOTHERAPY (*Soumis à  
publication*)**

Asevoaia, A.<sup>1</sup>, Capitain, O.<sup>1,2</sup>, Poirier A.L.<sup>3</sup>, Boisdron-Celle, M.<sup>1</sup>, Gamelin, E.<sup>1,2</sup>, Morel, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Oncopharmacology – Pharmacogenetics Department INSERM U892

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology and Clinical Pharmacology,

<sup>3</sup>Department 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

**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 administrated 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 (specially 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

## CHAPITRE 3

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/m<sup>2</sup>. 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/m<sup>2</sup> of intravenous leucovorin bolus and 400mg/m<sup>2</sup> of intravenous push of 5-FU for 10 minutes. The initial 5-FU dose was 2,500mg/m<sup>2</sup> 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



## CHAPITRE 3

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***

## CHAPITRE 3

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 MgCl<sub>2</sub>, 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  $\chi^2$  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

## CHAPITRE 3

using Kaplan-Meier plots, the log-rank test, the relative risk ratio, and its associated 95% confidence interval (CI) were calculate. Contingency tables ( $\chi^2$  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  $\alpha$  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, thrombocytopenia (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 thrombocytopenia), 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).

## CHAPITRE 3

These genotypes remains statistically significant for ERCC1 and XPD in Mutivariate 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

## CHAPITRE 3

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.



## CHAPITRE 3

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, Figier 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, Stohlmacher 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-amine 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. *Eur J 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, Stoecklacher 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, Stoecklacher 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. Stoecklacher 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, Lorient 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**

Gene (Site)	Primer sequences 5' → 3'	Anneling Tm (°C)
<b>ERCC1</b> Asn118Asn (118C>T)	(up) TGTGGTTATCAAGGGTCATCC (down) *CCAGCACATAGTCGGGAATTA (seq) ACTGAAGTTCGTGCG	58.0
<b>ERCC1</b> 3'UTR (8092C>A)	(up) *CCGGGGGCAGACTACACA (down) AGAGACAGTGCCCCAAGAGG (seq) GGACAAGAAGCGGAA	58.0
<b>XRCC1</b> Arg399Gln (399C>T)	(up) *CCCAAGTACAGCCAGGTCCTA (down) TGACTCCCCTCCAGATTCCT (seq) CGTGTGAGGCCTTACC	58.0
<b>XPB</b> K117R (445A>G)	(up) ATCTCTCAGGCTCCCGATGG (down) *TTGCAGCCCAACGCTGAC (seq) CCCATGTGCATGAGT	62.0
<b>XPA</b> 5'UTR (23A>G)	(up) TGGAGCTGGGAGCTAGGTC (down) *CTCCGCGGGTTGCTCTAA (seq) AGGTCCTCGGAGTGG	56.0
<b>XPD</b> Lys751Gln (751A>C)	(up) CGCTCTGGATTATACGGACATCTC (down) *GGAGTCACCAGGAACCGTTTAT (seq) GCTAGAATCAGAGGAGACG	58.0

\* Biotinylated primer

<i>Clinical data</i>		<i>Number (%)</i>
<b>Gender</b>	Male	70 (59.3)
	Female	48 (40.7)
<b>PS</b>	0-1	92 (78.0)
	2-3	26 (22.0)
<b>Median age (years)</b>		65.0
<b>Range (years)</b>		35-81
<b>Tumor histology</b>	Lieberkuhnian	105 (89.0)
	Mucinous	13 (11.0)
<b>Initial ACE levels</b>	Normal	35 (29.7)
	> 3 UI/mL	83 (70.3)
<b>Tumor site</b>	Colon	77 (65.3)
	Rectum	41 (34.7)
<b>Metastatic site</b>		
<b>Number of sites</b>	1	81 (68.6)
	2	30 (25.4)
	≥ 3	7 (6.0)
<b>Synchronous Metastasis</b>		109 (92.4)
<b>Location unique site</b>	Liver	66 (81.5)
	Lung	11 (13.6)
	Peritoneal, Carcinomatosis or nodes	4 (4.9)

<b>Table 3: Distribution of studied polymorphisms in global population</b>					
<b>SNP</b>		<b>Nb of patients</b>	<b>Frequency (%)</b>	<b>Allele frequency</b>	
				<i>p</i>	<i>q</i>
<b><i>ERCC1</i></b> Asn118Asn	C/C	19	16.1	0.39	0.60
	C/T	55	46.6		
	T/T	44	37.3		
<b><i>XRCC1</i></b> Arg399Gln	C/C	56	47.5	0.68	0.32
	C/T	49	41.5		
	T/T	13	11.0		
<b><i>XPA</i></b> 5'UTR	A/A	20	17.0	0.35	0.65
	A/G	43	36.4		
	G/G	55	46.6		
<b><i>XPB</i></b> K117R	A/A	118	100.0	1	
<b><i>XPD</i></b> 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>
<b>Neuropathy</b>	78	29	107
<b>Mucositis</b>	14	3	17
<b>Conjunctival effects</b>	11	0	11
<b>Diarrhoea</b>	3	0	3
<b>Hand-foot syndrome</b>	14	0	14
<b>Cardiac effects</b>	0	0	0
<b>Neutropaenia</b>	7	36	43
<b>Thrombopaenia</b>	31	4	35
<b>Anaemia</b>	39	1	40
<b>Nausea</b>	27	0	27
<b>Alopecia</b>	22	0	22
<b>Asthaenia</b>	62	5	67
<b>Total (n)</b>	<b>308</b>	<b>78</b>	<b>386</b>

**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>	
		<b>OR [CI 95%]</b>	<b>p</b>
<b>ERCC1</b>	C/C	1	<b>0.0255</b>
	C/T	2.214 [0.757; 6.480]	
	T/T	0.719 [0.231; 2.237]	
<b>XPB</b>	A/A	1	<b>0.0310</b>
	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>
<b>Complete Response (CR)</b>	3 (2.5)	23 (20.3)
<b>Partial Response (PR)</b>	88 (74.5)	40 (35.4)
<b>Overall Response (OR)*</b>	91 (77.1)	63 (55.7)
<b>Disease Control</b>	104 (88.1)	87 (77.0)
<b>Disease Progression</b>	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
<b>ERCC1 (Asn118Asn)♦*</b>		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]	
<b>ERCC1 (3'UTR)♦*</b>		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]	
<b>ERCC1_CD*</b>		0,3391		0,0684
C/C + C/T	1		1	
T/T	0,815 [0,535; 1,240]		0,695 [0,470; 1,028]	
<b>XPA (5'UTR)♦*</b>		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]	
<b>XPD (Lys751Gln)♦*</b>		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]	
<b>XRCC1 (Arg399Gln)♦*</b>		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]	
<b>XRCC1_CD</b>		<b>0,0072</b>		<b>0,0027</b>
C/C + C/T	1		1	
T/T	2,327 [1,257; 4,306]		2,512 [1,376; 4,587]	
<b>XRCC1 and ERCC1</b>		0,3182		<b>0,0268</b>
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

CD: coded variable

FIGURES

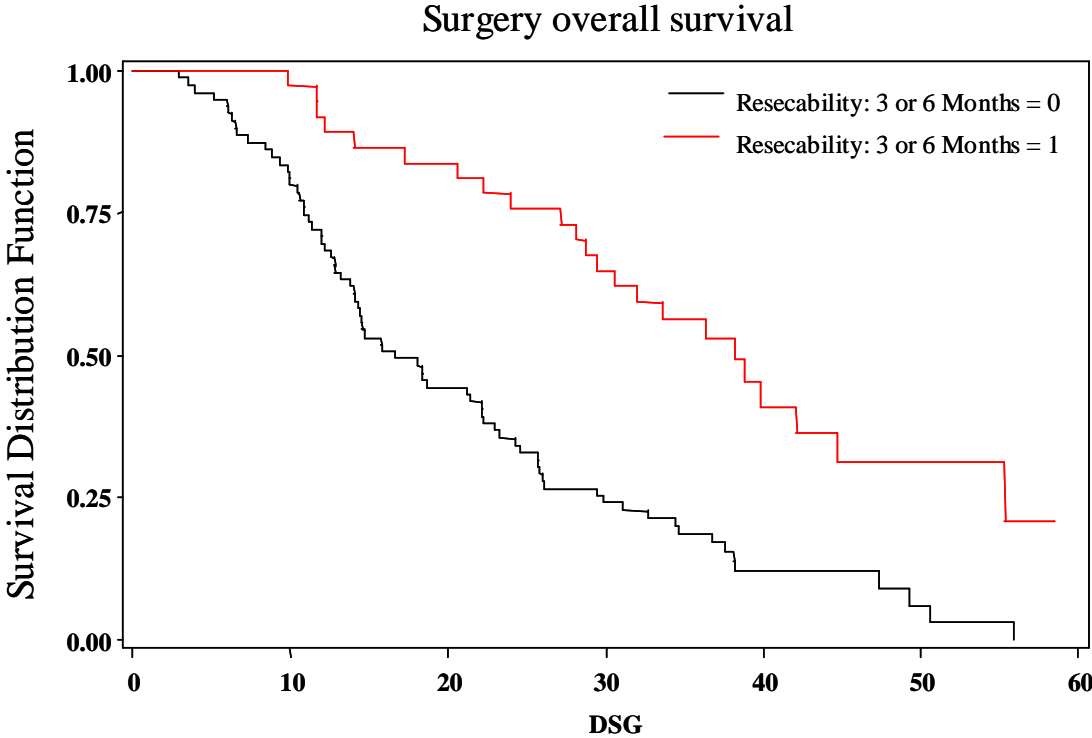


Figure 1. *Univariate overall survival of patients according to secondary carried out metastasis surgery (in bold).*

## **III.2. ERCC1 et son rôle dans la résistance à l'Oxaliplatine**

Afin d'évaluer le rôle d'ERCC1 ou de ses partenaires dans la résistance à l'Oxaliplatine, nous avons travaillé sur deux lignées coliques : HT29 (*lignée provenant d'un adénocarcinome colorectal*) et HCT116 (*lignée provenant d'un carcinome colorectal*). La particularité qui nous a fait choisir ces deux lignées comme outil de travail est la présence d'un statut mutationnel différent de l'oncogène K-Ras. En effet, les cellules HCT116 présentent la mutation constitutionnelle G13D de K-Ras, tant que les cellules HT29 sont sauvages pour K-Ras. Les deux types cellulaires ont été cultivés en présence d'Oxaliplatine. Nous avons déterminé ainsi si l'activité d'ERCC1 était modulée par cette molécule, si ERCC1 jouait un rôle dans la survie cellulaire en présence d'Oxaliplatine, mais aussi si la variation de l'expression de cette protéine modifiait l'expression de ces partenaires, notamment XPA et XPF.

### **III.2.1. Détermination de l'activation d'ERCC1 par l'Oxaliplatine**

#### **III.2.1.1. Etude de cytotoxicité à l'Oxaliplatine**

L'efficacité d'un traitement à l'Oxaliplatine a été évaluée sur les deux modèles cellulaires par des tests d'inhibition de croissance cellulaire. Ceux-ci nous ont permis de déterminer l'IC50 de l'Oxaliplatine pour les cellules HT29 et HCT116. Les valeurs obtenus sont indiquées dans la figure III.2 :

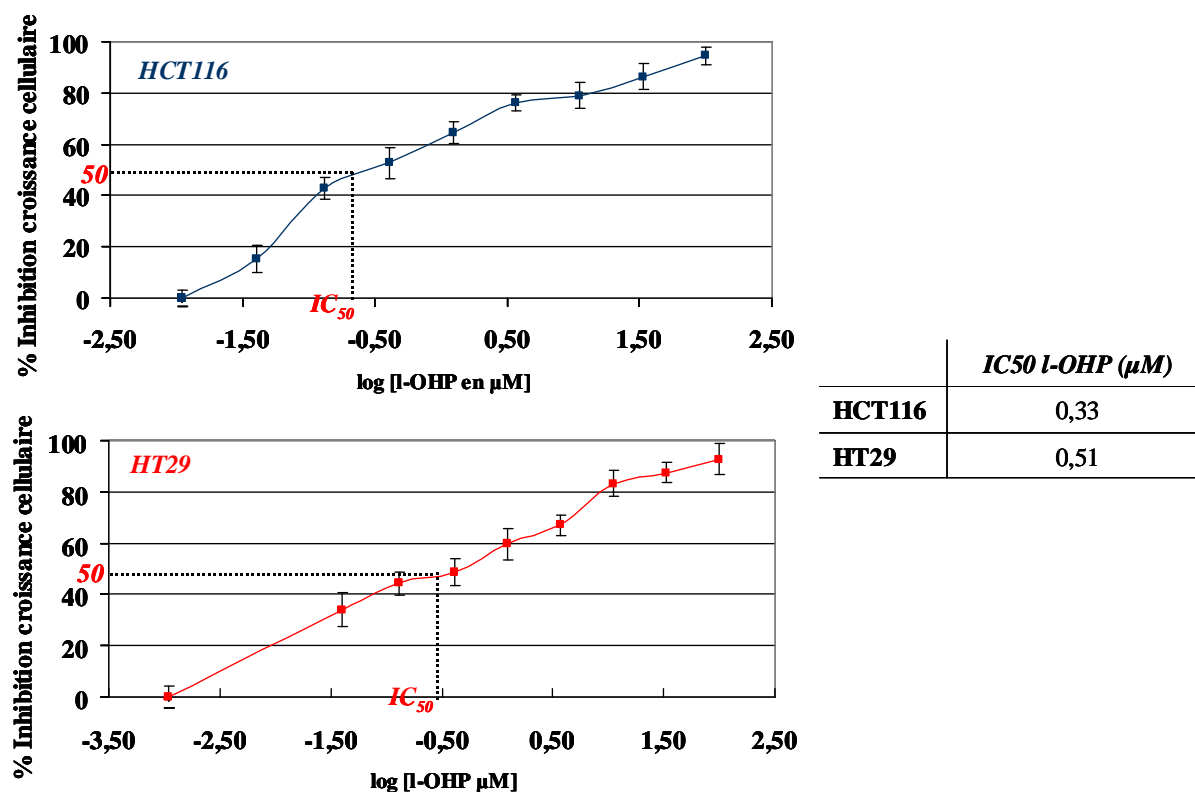


Fig. III.2. Inhibition de croissance cellulaire des HCT116 et HT29 après 48h de traitement et détermination de la valeur des  $IC_{50}$  ( $n = 3$ )

L'IC<sub>50</sub> de l'Oxaliplatine est de 0,33µM pour les cellules HCT116 tandis que pour les cellules HT29 elle est de 0,51µM. Ces résultats indiquent que les cellules HT29 manifestaient une résistance légèrement plus grande à l'Oxaliplatine que les cellules HCT116, la valeur d'IC<sub>50</sub> pour les cellules HCT116 étant environ 1,5 fois plus petite.

### III.2.1.2. Etude de la variation de l'expression d'ERCC1 au cours du temps

#### III.2.1.2.1. Evaluation de l'expression d'ARNm

Nous avons étudié la variation de l'expression d'ARNm d'ERCC1 au cours du temps, après stimulation à l'Oxaliplatine. Le niveau d'expression d'ERCC1 a été normalisé par rapport à l'ARNm de la G3PDH (Figure III.3).

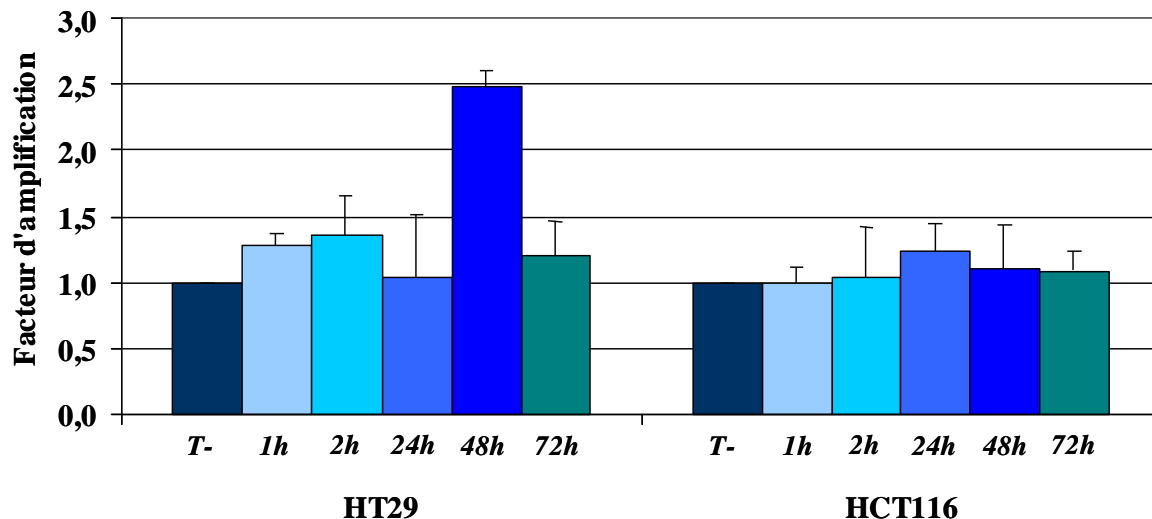


Fig. III.3. Expression d'ARNm d'ERCC1 après différents temps de stimulation à l'Oxaliplatine

L'analyse de l'expression d'ARNm d'ERCC1 montre que dans les cellules HCT116 l'Oxaliplatine n'induit pas de variation de l'expression de l'ARNm d'ERCC1 au cours du temps. Par contre, dans les cellules HT29 nous avons constaté une amplification transitoire de l'expression d'ARNm d'ERCC1 d'un facteur 2,5, après 48h de traitement.

#### III.2.1.2.2. Evaluation de l'expression de la protéine

Nous avons ensuite visualisé ERCC1 par Western blot à différents temps de stimulation dans les deux types cellulaires (Figure III.4).

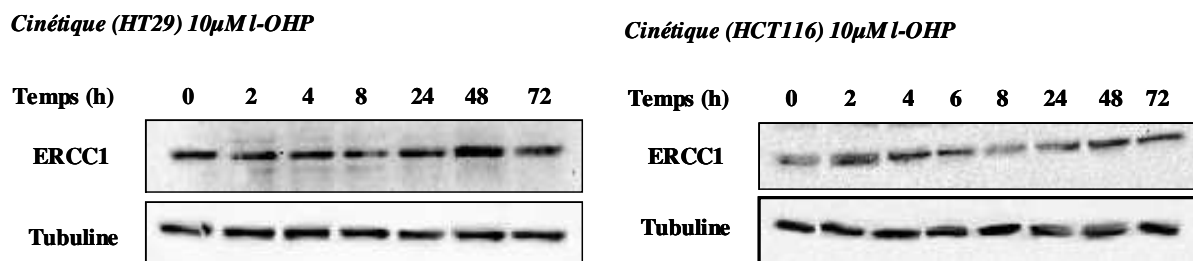


Fig. III.4. Western blot réalisé après différents temps de stimulation à l'Oxaliplatine

Les résultats montrent que l'Oxaliplatine ne module pas l'expression d'ERCC1 jusqu'à 72h d'exposition dans les cellules HCT116. Par contre, dans les cellules HT29 nous avons constaté une augmentation de l'expression de cette protéine, 48h après le traitement, correspondant à la surexpression de l'ARNm.

La variation de l'expression de la protéine ERCC1, après 48h de traitement, a été analysée également par FACS, suite à son marquage et les résultats recueillis sont rendus dans la Figure III.5 :



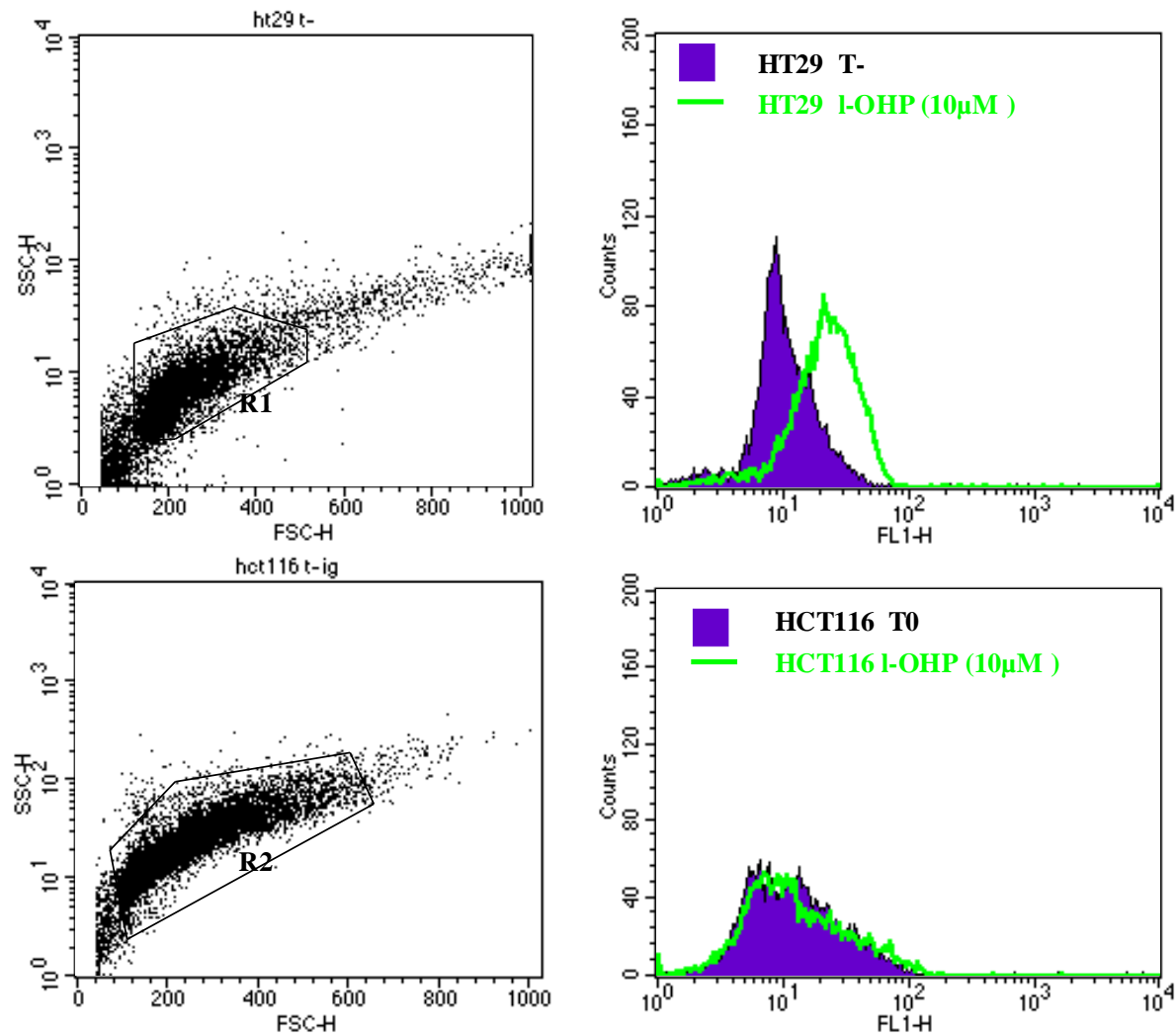


Fig. III.5. Analyse de l'expression d'ERCC1 par marquage au FACS après 48h de stimulation à l'Oxaliplatine

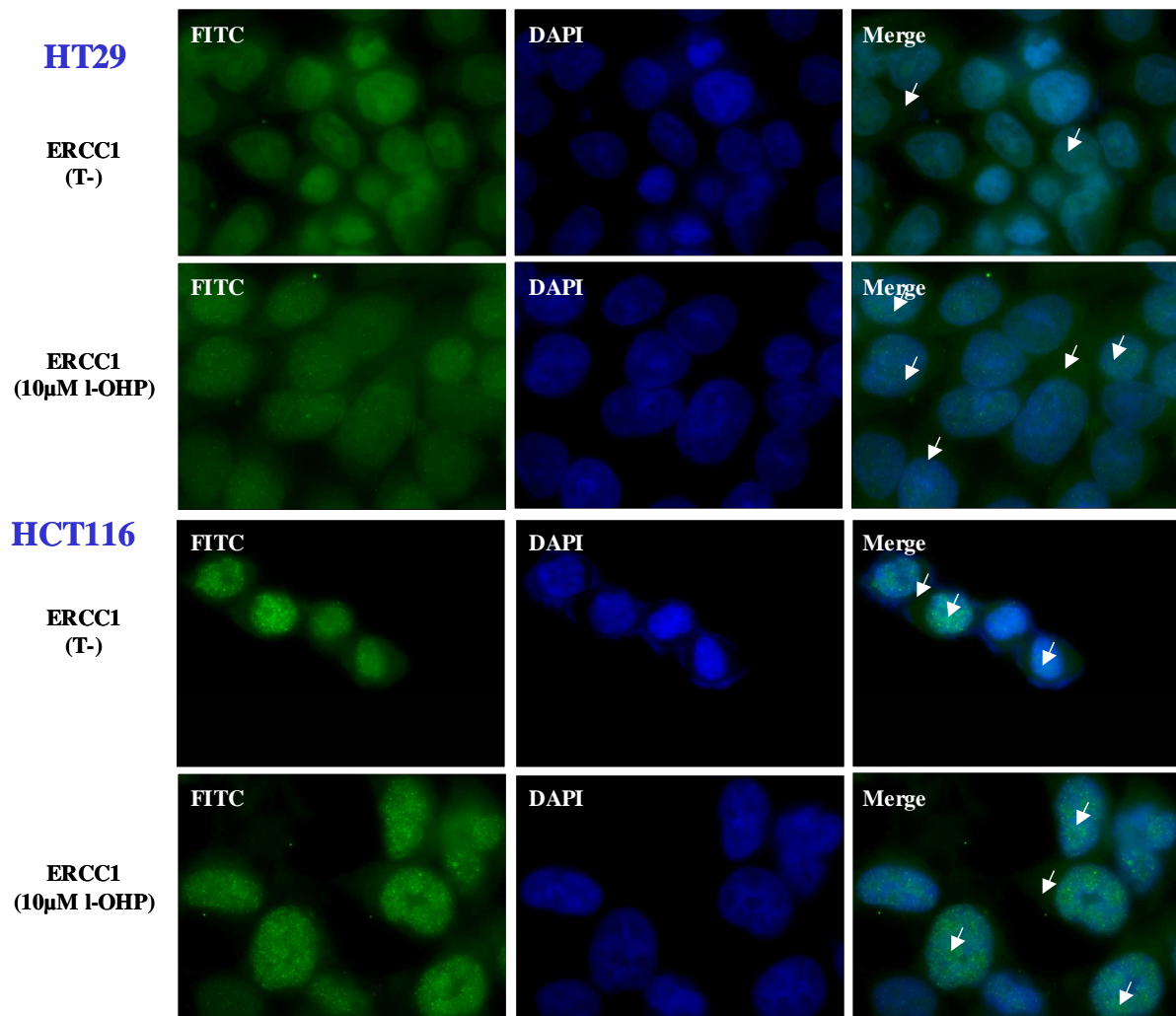
Après 48h de stimulation à l'Oxaliplatine (I-OHP) nous avons constaté, dans les cellules HT29, une variation de l'expression d'ERCC1 par rapport au contrôle. Dans les cellules HCT116 l'expression d'ERCC1 ne se modifie pas suite au traitement. Les résultats obtenus par FACS ont confirmé ainsi les observations recueillis par Western blot et par qPCR.

### III.2.1.3. Etude de la localisation cellulaire d'ERCC1

Nous nous sommes intéressés par la suite à la localisation cellulaire d'ERCC1, en émettant l'hypothèse que la localisation de cette protéine pourrait influencer l'efficacité de réparation par le système NER. Afin de définir la localisation d'ERCC1, dans les deux lignées cellulaires, avant et après une stimulation à l'Oxaliplatine, nous avons utilisé deux techniques. Dans un premier temps, l'étude de l'immunofluorescence nous a permis d'identifier la

localisation d'ERCC1 dans les compartiments cellulaires. Ensuite à l'aide de la technique de Western blot nous avons confirmé les résultats obtenus par immunofluorescence.

Lors du traitement à l'Oxaliplatine (10 $\mu$ M pendant 48h), la protéine ERCC1 a été tout d'abord visualisée par immunofluorescence, dans les deux types cellulaires. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre II.1.1.3.1, ERCC1 a été détecté par immunomarquage indirect avec un anticorps secondaire couplé au FITC, tandis que l'ADN nucléaire a été visualisé par le DAPI, après dégradation des ARN. Les résultats obtenus sont présentés dans la Fig. III.6 :



**Fig. III.6.** Localisation cellulaire d'ERCC1 visualisée après 48h de stimulation à l'Oxaliplatine (Grossissement x100)

Suite à l'étude effectuée, nous avons constaté qu'ERCC1 n'est pas clairement compartimentalisé dans aucun des deux types cellulaires. ERCC1 a été remarqué, que ce soit avant ou après le traitement, tant au niveau du noyau qu'au niveau du cytoplasme.

Nous avons donc visualisé l'expression d'ERCC1 par Western blot sur des fractions cellulaires cytoplasmiques ou nucléaires après 48h de traitement. Nous avons donc pu

confirmer la présence d'ERCC1 dans les deux compartiments cellulaires, dans les deux lignées cellulaires (Figure III.7).

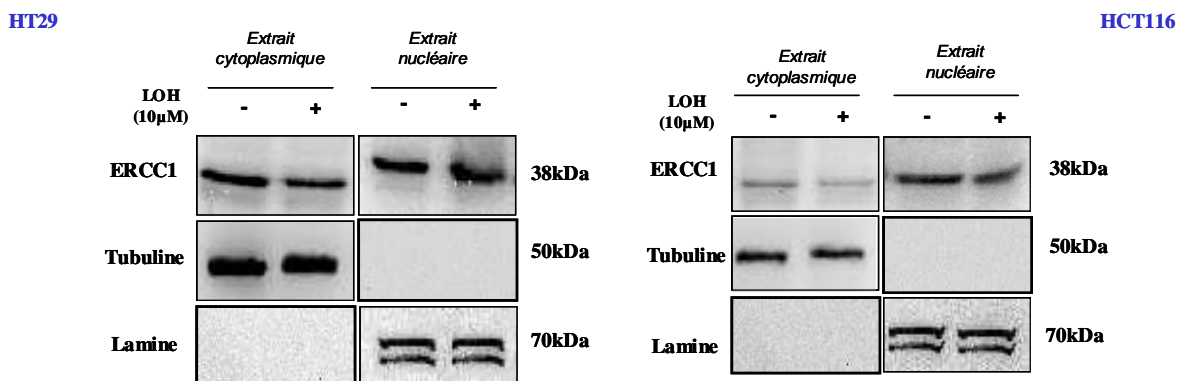


Fig. III.7. Western blot réalisé dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques, après 48h de stimulation à l'Oxaliplatine

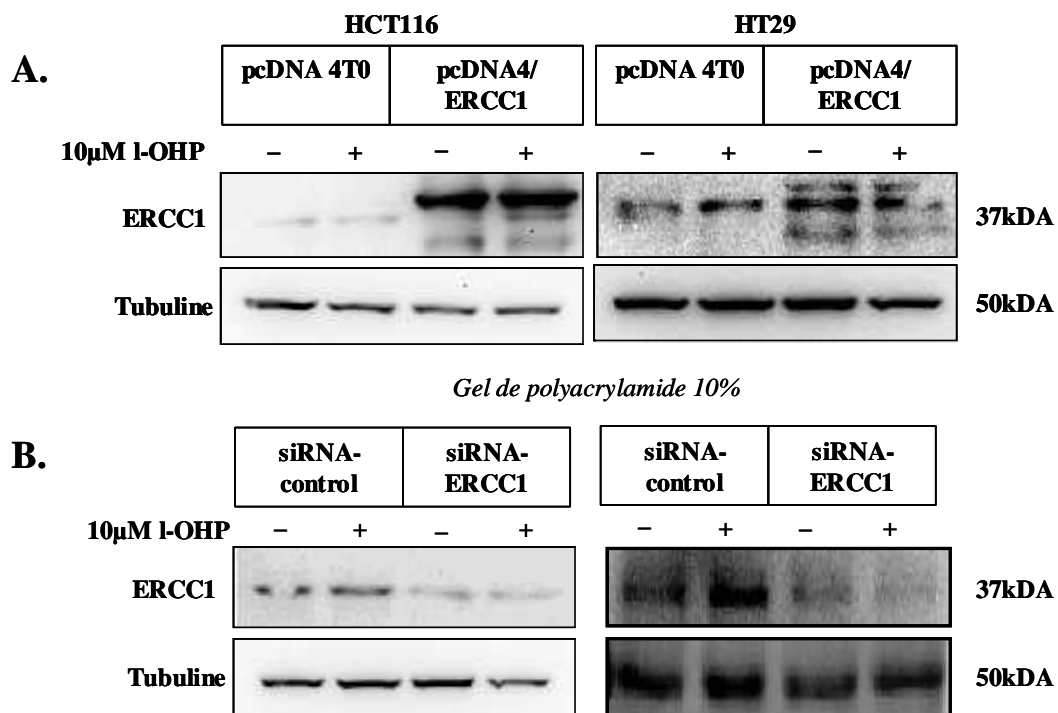
Par ailleurs, nous avons remarqué que la stimulation à l'Oxaliplatine (10µM pendant 48h) est à la base d'une augmentation de l'expression d'ERCC1 dans le compartiment nucléaire des cellules HT29, mais aussi d'une diminution de son expression dans le compartiment cytoplasmique. En même temps, dans les cellules HCT116 les résultats montrent qu'il y a une très modeste diminution de l'expression d'ERCC1 dans le compartiment cytoplasmique.

## III.2.2. Impact de l'inhibition ou de la surexpression d'ERCC1 sur la survie cellulaire en présence de l'Oxaliplatine

### III.2.2.1. Etude de la survie cellulaire

Notre but a été de nous intéresser à l'effet biologique de la variation de l'expression d'ERCC1 dans les deux lignées cellulaires soumises au traitement avec différentes concentrations de l'Oxaliplatine.

Dans ce contexte, nous avons donc voulu regarder l'effet cytotoxique de l'Oxaliplatine sur nos modèles cellulaires, soit par surexpression d'ERCC1 par la transfection d'un plasmide exprimant l'ADNc d'ERCC1, soit par sous-expression consécutive à la transfection d'un siRNA modulant l'expression d'ERCC1. La surexpression ainsi que l'inhibition de l'expression d'ERCC1, que ce soit par la transfection de pcDNA4-ERCC1 ou par la transfection du siRNA dirigé contre ERCC1, ont été analysées par Western blot (Figure III.8):



**Fig. III.8.** Vérification de l'expression d'ERCC1 par Western blot (A. cellules surexprimant ERCC1 ; B. cellules ayant ERCC1 éteint via la transfection de siRNA-ERCC1)

Les résultats de blots montrent que la transfection du siRNA-ERCC1 a été efficace dans les deux types cellulaires car, par rapport à la situation control, nous avons obtenu une diminution importante de l'expression d'ERCC1 (Fig. III.8 B.). Par contre, les blots obtenus suite à la transfection d'un plasmide contenant l'ADNc d'ERCC1 ont révélé la présence d'une bande supplémentaire, pour laquelle nous n'avons pas une explication, mais nous soupçonnons qu'elle pourrait représenter de l'ERCC1 endogène (Fig. III.8 A.).

Les tests de cytotoxicité à la sulforhodamine B que nous avons réalisés après la surexpression ou à l'inhibition de l'expression de la protéine d'intérêt, nous ont permis de déterminer l'IC<sub>50</sub> de l'Oxaliplatine par rapport aux cellules non-traitées. Les résultats obtenus dans les deux lignées cellulaires, ainsi que les valeurs IC<sub>50</sub> obtenues suite aux traitements réalisés sont représentés dans la Figure III.9 :

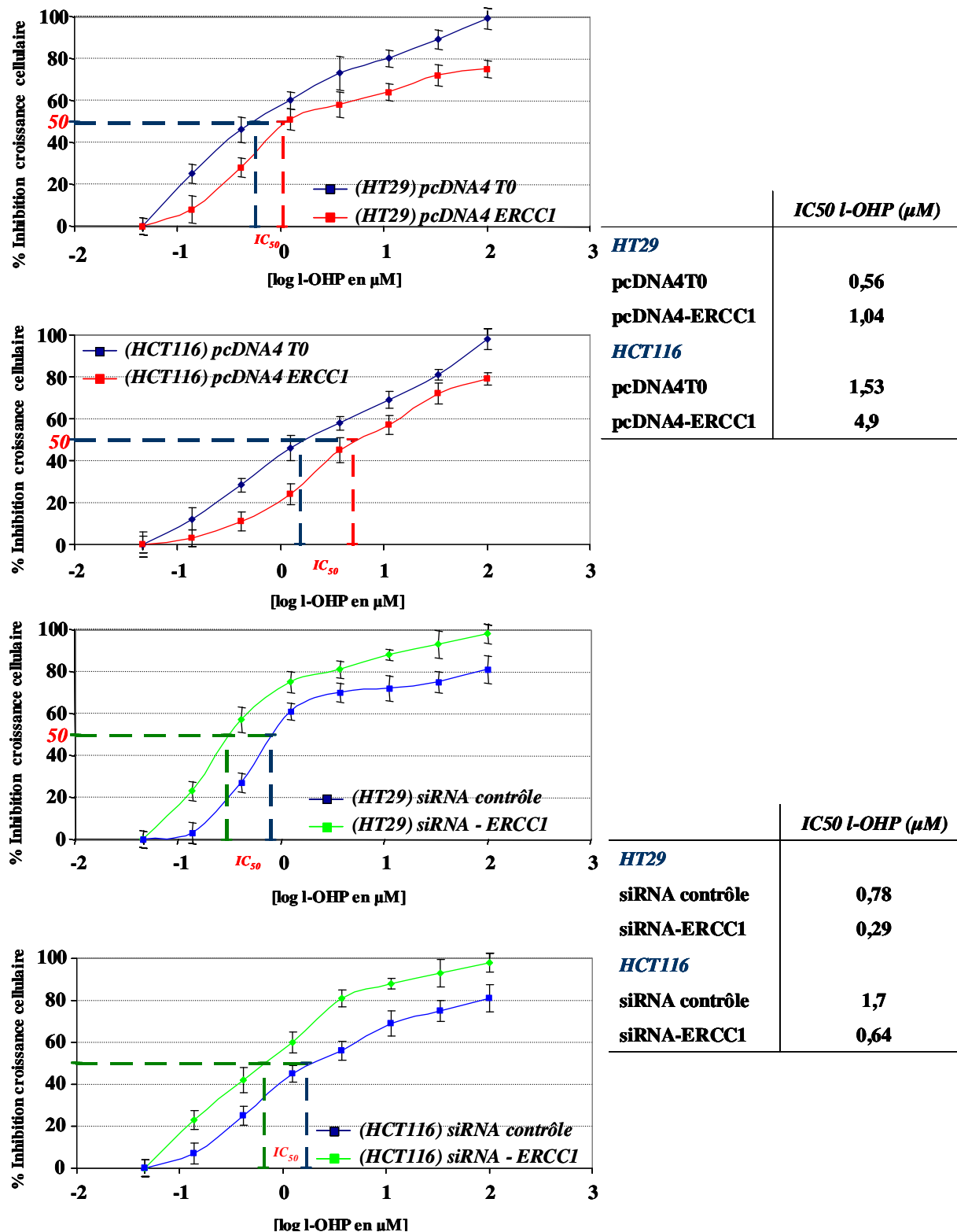


Fig. III.9. Détermination de la valeur  $IC_{50}$  dans les deux lignées cellulaires surexprimant ERCC1 ou ayant éteint ERCC1 via la transfection d'un siRNA-ERCC1 (n=3)

Nos observations montrent qu'ERCC1 joue un rôle dans la survie cellulaire suite un traitement à l'Oxaliplatine. Les cellules surexprimant ERCC1 ont manifesté une augmentation de croissance cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec un plasmide contrôle. Ainsi,

l'IC<sub>50</sub> de l'Oxaliplatine pour les cellules HT29 surexprimant ERCC1 est de 1,04µM tandis que celle de cellules HT29 transfectées avec un plasmide contrôle est de 0,56µM. Concernant les cellules HCT116, la valeur de l'IC<sub>50</sub> obtenue suite à la transfection d'ERCC1 est de 4,9µM pendant que celle de la lignée considérée comme contrôle est de 1,53µM. Ces données indiquent donc que la surexpression d'ERCC1 est responsable d'une augmentation de la résistance cellulaire d'environ 1,5 - 3 fois dans les cellules transfectées par rapport aux cellules contrôle. Par contre, les cellules sous-exprimant ERCC1 suite à la transfection d'un siRNA ont présenté une diminution de la croissance cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle, montrant donc une augmentation de la sensibilité au traitement. Nous avons ainsi constaté que pour les cellules HT29 la valeur IC<sub>50</sub> d'Oxaliplatine obtenue après la transfection d'un siRNA-ERCC1 a été 2,68 fois inférieure à celle de cellules HT29 considérées comme contrôle (0,78 vs 0,29). De la même manière, la transfection d'un siRNA-ERCC1 dans les cellules HCT116 a été responsable d'une augmentation de 2,65 fois de la sensibilité à l'Oxaliplatine par rapport au contrôle (1,7 vs 0,64).

### **III.2.3. Effet d'ERCC1 sur l'expression des gènes pouvant induire des résistances à l'Oxaliplatine**

Nous avons montré dans le chapitre III.1.2 que ERCC1 pouvait influencer sur la réponse cellulaire à l'Oxaliplatine et donc, la survie au traitement. En même temps, ERCC1 est une protéine qui se trouve en relation de nombreuses protéines impliquées dans les processus de réparation des lésions induites par les agents anticancéreux. Dans ce complexe, la fonction d'ERCC1 est, d'une part, de stabiliser XPF et, d'autre part, de fournir un lien fonctionnel au système de NER par son interaction avec la protéine XPA. Ainsi, notre but a été de nous intéresser par la suite à l'étude de l'expression basale d'ARNm de ces partenaires dans les conditions d'inhibition totale ou de la restauration de l'expression d'ERCC1.

L'impact de la surexpression ou de l'inhibition d'ERCC1 sur l'expression des gènes de XPA et XPF a été observé dans les deux types cellulaires, après stimulation (48h) à l'Oxaliplatine (10µM). Les résultats obtenus suite à l'analyse de l'expression de ces ARNm sont indiqués dans les Figures III.10 et III.11 :

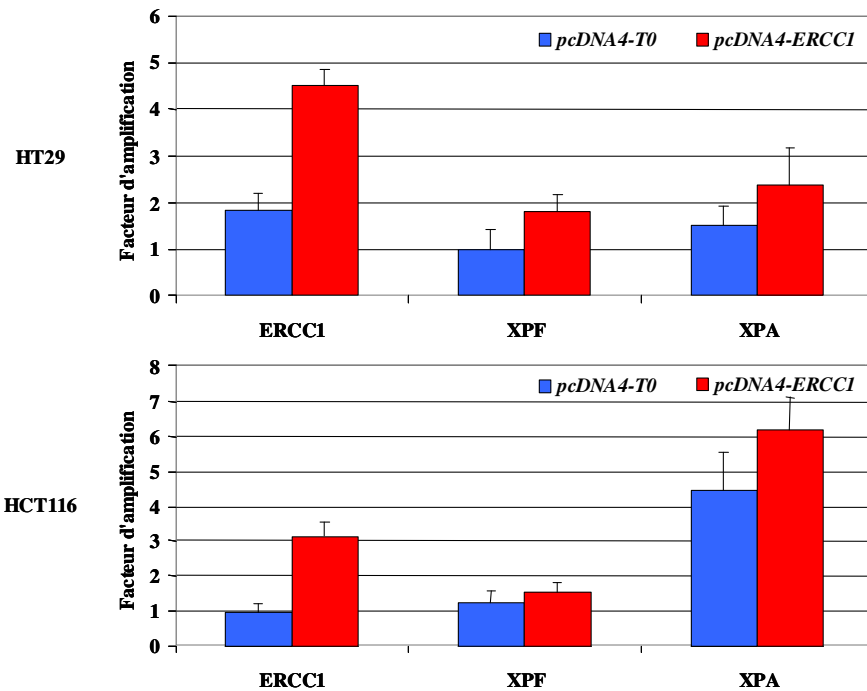


Fig. III.10. Répercussion de la surexpression d'ERCC1 sur l'expression d'ARNm de XPF et XPA après 48h de traitement (n = 3)

La surexpression d'ERCC1 dans les deux types cellulaires induit une augmentation de l'expression d'ARNm de XPF (facteur d'amplification de 1,80 dans HT29 et 1,56 dans HCT116) et XPA (facteur d'amplification de 2,37 dans HT29 et 6,21 dans HCT116). Cette variation de l'expression basale de ces gènes n'est pas observée dans les cas contrôle quand les cellules ont été transfectées avec un plasmide vide (Figure III.10). Cependant, dans les conditions contrôle, les cellules HCT116 ont présenté une augmentation de l'expression d'ARNm de XPA (facteur d'amplification de 4,47).

Par opposition à la surexpression d'ERCC1, l'inhibition de l'expression de ce gène est responsable d'une diminution de l'expression d'ARNm d'XPA, tant dans les cellules HT29 (facteur d'inhibition de 1,28) que dans les cellules HCT116 (facteur d'inhibition de 2,78) (Figure III.11). L'expression d'XPF est très faiblement modifiée par l'inhibition d'ERCC1.

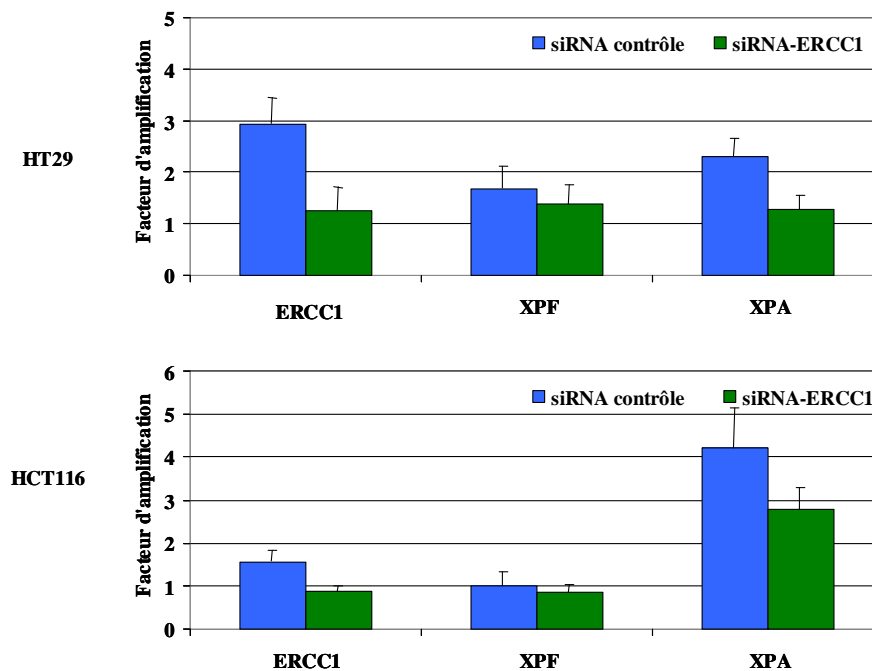


Fig. III.11. Répercussion de l'inhibition d'expression d'ERCC1 sur l'expression d'ARNm de XPF et XPA après 48h de traitement (n = 3)

Vu ces résultats, ERCC1 pourrait être à l'origine d'une modulation de l'expression de ses partenaires, mais plus particulièrement de l'XPA.

### III.2.4. L'impact de statut mutationnel de Ras sur l'expression d'ERCC1

Au sein du notre laboratoire il a été montré que la transfection stable d'un plasmide contenant l'ADNc du RasV12 dans une lignée cellulaire présentant le gène K-Ras de type non-muté (notamment HT29) suivie par la stimulation avec de l'Oxaliplatine pendant 48h a comme effet une augmentation de l'expression d'ARNm d'ERCC1 (figure III.12).

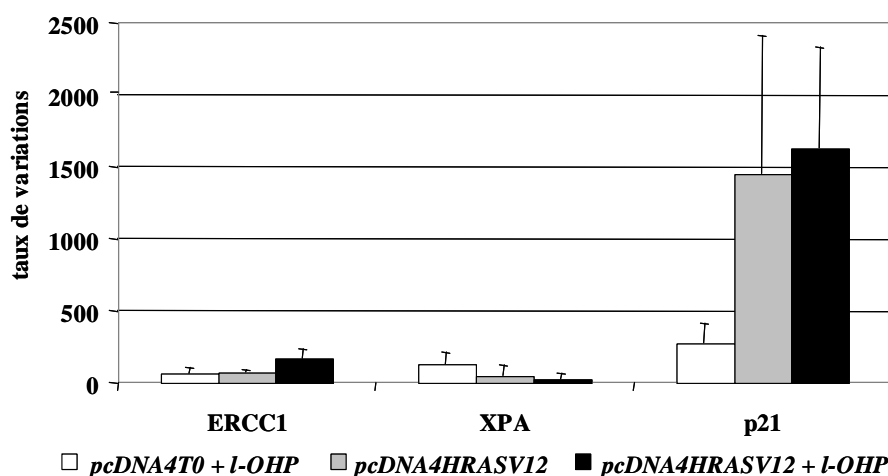


Fig. III.12. Répercussion de la transfection stable du RasV12 sur l'expression d'ARNm d'ERCC1 après 48h de traitement (n = 3)



En effet, il a été remarqué qu'après la transfection stable de HRasV12 dans les cellules HT29 (présentant un statut non-muté de Ras) et après une stimulation de 48h à l'Oxaliplatine, l'expression d'ARNm d'ERCC1 augmente par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide vide. Par ailleurs, la transfection de HRasV12, si elle n'est pas suivie d'une stimulation à l'Oxaliplatine, n'est pas responsable d'une augmentation de l'expression d'ERCC1. Concernant la variation de l'expression d'ARNm de XPA, il a été constaté que celle-ci diminuait quand HRasV12 a été transfecté dans la cellule, effet qui était encore plus marquant quand les cellules ont été stimulées à l'Oxaliplatine pendant 48h. Donc il semblerait que la présence des mutations de Ras dans les cellules pourrait moduler l'expression d'ERCC1 et de XPA suite à un traitement à l'Oxaliplatine.

### **III.3. Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux**

La chimiothérapie des cancers colorectaux a été profondément modifiée ces dernières années. Alors même que la place respective de l'Irinotécan et de l'Oxaliplatine n'était pas complètement définie, les thérapies ciblées sont arrivées. Les thérapies ciblées ont permis d'améliorer la prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux métastatiques, en prolongeant leur survie sans progression et leur survie globale de plusieurs mois et en permettant de réséquer plus de métastases. Toutefois ces observations sont particulièrement liées au statut tumoral de l'oncogène K-Ras. En effet, seuls les patients ayant des tumeurs sans mutation de l'oncogène K-Ras semblent tirer des bénéfices suite à l'utilisation des thérapies ciblées, la présence d'une mutation K-Ras étant liée à l'absence de réponse et à une moins bonne survie. La détermination du statut K-Ras est désormais un prérequis indispensable dès qu'un anticorps anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) ou panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>), est prescrit chez les patients atteints de cancers colorectaux métastatiques.

Par ailleurs, de études *in vitro* suggèrent que le statut Ras muté peut conférer une résistance aux sels du platine, éventuellement à travers la surexpression d'ERCC1, marqueur qui a été démontré d'être associé à la sensibilité de l'Oxaliplatine [Youn *et al.*, 2004].

Dans le cadre particulier d'un régime FOLFOX, la présence des mutations de l'oncogène K-Ras pourrait influencer l'efficacité du traitement induisant une hyperexpression d'ERCC1.

Vu l'importance que le statut mutationnel de l'oncogène K-Ras a dans l'efficacité des traitements à base des anticorps anti-EGFR, nous avons considéré nécessaire d'explorer dans cette dernière partie de la thèse une méthode rapide, sensible et fiable de détermination pré-thérapeutique des mutations de Ras. Il s'agit de la technique de pyroséquençage. Les résultats visant la sensibilité de cette technique ainsi que les résultats de l'étude STIC sont présentées par la suite.

### **III.3.1. Détermination *in vitro* du seuil minimum de détection des mutations de K-Ras par pyroséquençage**

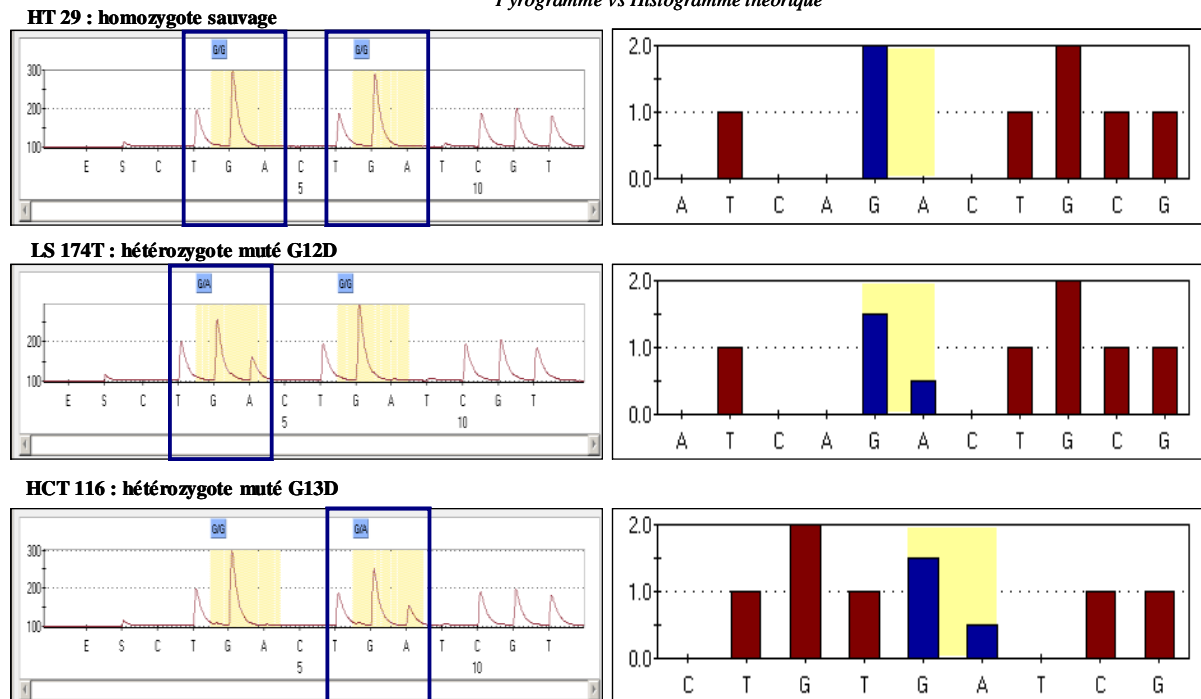
Avant d'analyser la sensibilité de la technique du pyroséquençage vis-à-vis de la détection des mutations de l'oncogène K-Ras, nous avons étudié son statut mutationnel dans les trois lignées utilisées dans l'étude. Ainsi, les analyses effectuées ont montré que les cellules HT29 sont sauvages pour le codon 12 et 13, en revanche les cellules LS174T ont été trouvées hétérozygotes mutées pour le codon 12 et les cellules HCT116 ont un génotype hétérozygote muté pour le codon 13 (Figure III.13).

La séquence analysée pour les codons 12 et 13 :

*Codon 12* : TGG/A TGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG

*Codon 13* : TGGTGG/A CGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG

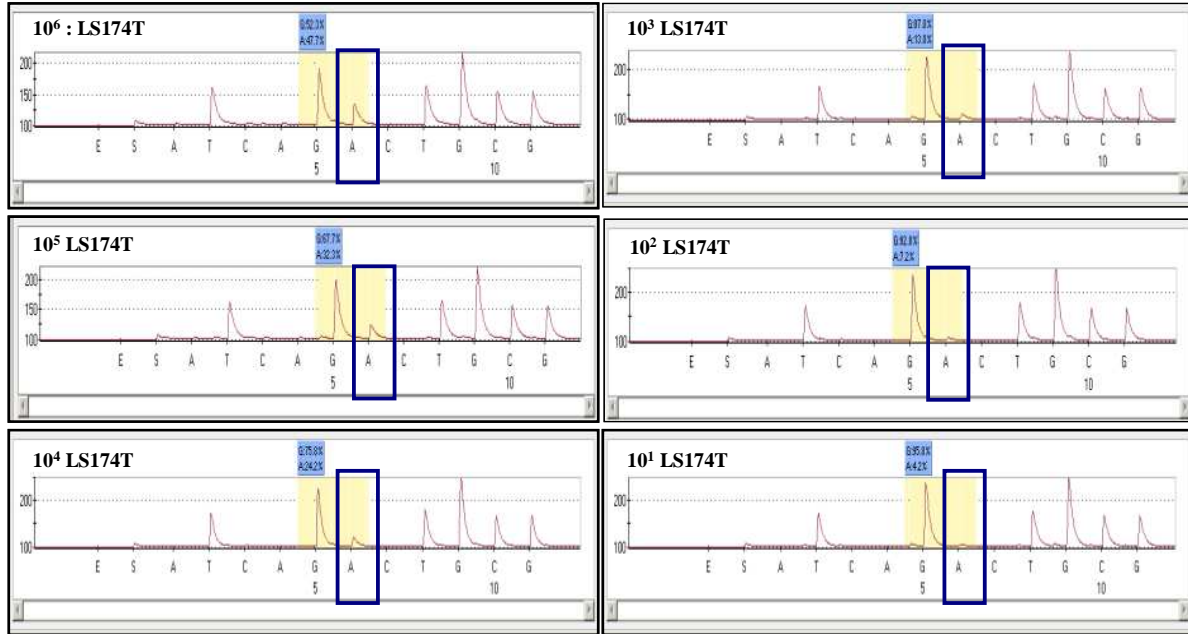
Pyrogramme vs Histogramme théorique



**Fig. III.13. Statut du K-Ras dans les lignées cellulaires utilisées comme témoin – Comparaison de l'allure de la pyrogramme obtenue avec l'histogramme théorique**

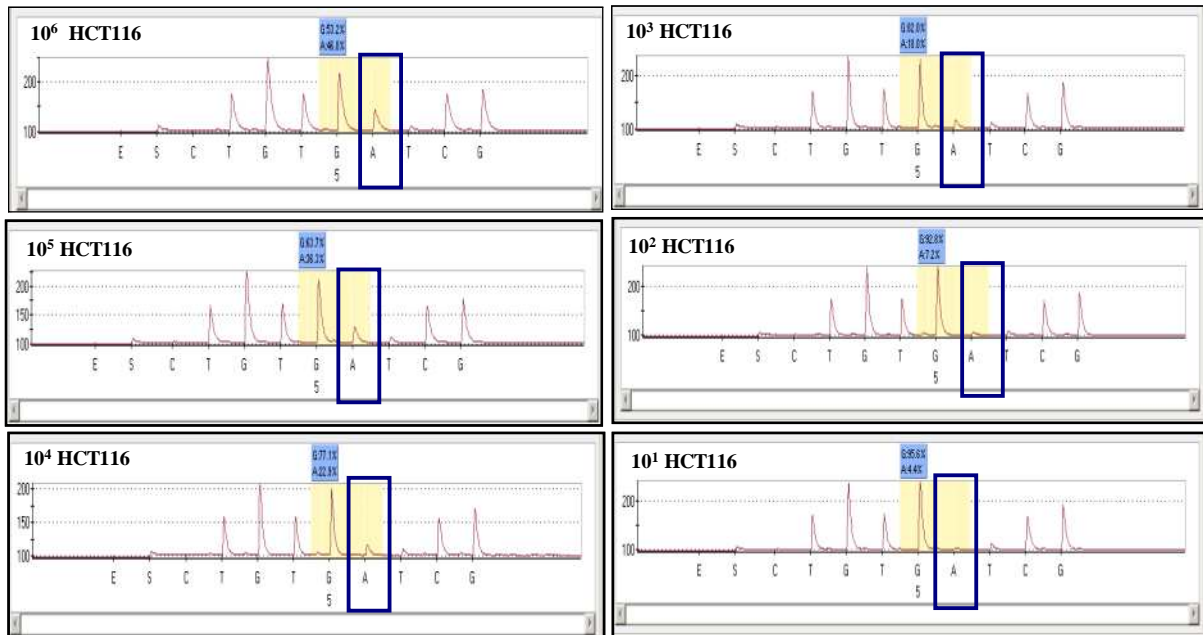
Ensuite, en utilisant les ADN<sub>g</sub> extraits à partir des mélanges cellulaires que nous avons décrits précédemment dans le deuxième chapitre (II.3.1.1 ; pag. 102), nous avons étudié la limite de détection des mutations G12D (codon 12) et G13D (codon 13) par pyroséquençage. Pour toutes les ADN<sub>g</sub> analysés, nous avons obtenu des pyrogrammes qui ont été comparées, par la suite, aux histogrammes théoriques, afin d'établir le pourcentage d'allèle muté (Figure III.14 et Figure III.15). Les témoins négatifs étant négatifs, les pyrogrammes ont pu être interprétés.

A. Codon 12



**Fig. III.14.** Analyse du seuil minimum de détection des mutations des codons 12 et 13 par pyroséquence : **Détection du pourcentage d'allèle muté G12D dans des ADNg provenant d'un mélange de cellules HT29 et LS174T**

B. Codon 13



**Fig. III.15.** Analyse du seuil minimum de détection des mutations des codons 12 et 13 par pyroséquence : **Détection du pourcentage d'allèle muté G13D dans des ADNg provenant d'un mélange de cellules HT29 et HCT116**

Nous avons constaté que pour les mélanges contenant environ  $10^1$  cellules K-Ras muté, que se soit pour le codon 12 ou pour le codon 13, il y a une importante diminution du pic de A, correspondant à la mutation recherchée (GGT→GAT caractérisant la mutation G12D et

GGC→GAC correspondant à la mutation G13D). Le pourcentage d'allèle muté pour le codon 12 est de 4,2%. Pour la mutation G13D le seuil de détection est à 4,4%. En dessous de ce seuil, les mutations ne sont plus détectables, car la hauteur des pics est inférieure à 7 fois le bruit de fond.

### III.3.2. Essai STIC : contrôle qualité de la technique du pyroséquençage

L'analyse des échantillons a été exécutée par la plate-forme de génétique moléculaire INCa (*Institut national du cancer*) d'Angers. L'étude réalisée par pyroséquençage nous a permis également de déterminer le pourcentage d'allèle muté présent dans chaque échantillon.

Les résultats obtenus suite à l'étude sont résumés dans le Tableau III.1 :

**Tab. III.1. Tableau indiquant les résultats obtenus suite à l'analyse réalisée avec les techniques MASA et pyroséquençage**

Mutations Codon 12	Pyroséquençage Nb (%)	STIC Nb (%)	Mutations Codon 13	Pyroséquençage Nb (%)	STIC Nb (%)
WT*	24 (25,0)	12 (12,5)			
G12D	12 (12,5)	12 (12,5)	G13D	12 (12,5)	12 (12,5)
G12V	12 (12,5)	12 (12,5)			
G12A	9 (9,38)	12 (12,5)			
G12R	6 (6,25)	12 (12,5)			
G12C	12 (12,5)	12 (12,5)			
G12S	9 (9,38)	12 (12,5)			

\* WT : sauvage

D'une manière générale nous avons constaté que la détection des mutations G12D, G12V, G12C, G13D ainsi que l'analyse des échantillons sans mutations de K-Ras a été réalisée sans problèmes, indifféremment du pourcentage de l'allèle muté dans le cas des échantillons mutés K-Ras. Cependant les identifications des échantillons mutés G12A et G12S ont été enregistré pour 9 échantillons au lieu de 12, le reste de 3 échantillons étant rendu comme non porteurs de mutations K-Ras. Dans le cas particulier de la mutation G12R, sa présence a été remarquée seulement pour la moitié des échantillons porteurs de cette mutation. Toutefois, concernant les ADNg contenant cette mutation il a été annoncé

## CHAPITRE 3

ultérieurement la présence d'une mutation supplémentaire lors de la construction du clone, ce qui pourrait expliquer la difficulté particulière rencontrée pour la juste détection de cette mutation.

Par ailleurs, l'analyse du pourcentage d'allèle muté pour les échantillons que nous n'avons pas détectés (notamment G12A, G12S et G12R) montre qu'il est inférieur à 5%. L'analyse de sensibilité que nous avons réalisée dans la première partie de cette étude a montré pour la technique du pyroséquençage un seuil minimum de détection des mutations de K-Ras d'environ 5%, au-delà de ce seuil la détection étant plus difficile.

## IV. Discussions, Conclusions et Perspectives

L'apparition des phénomènes toxiques, ainsi que les résistances au traitement, représentent un obstacle majeur à l'efficacité des molécules anti-tumorales. Dans ce but, l'utilisation de ces molécules nécessite un suivi thérapeutique très rigoureux qui doit prendre en compte tant les particularités génétiques ou épigénétiques de l'individu, que celles de la tumeur. La totalité de ces caractéristiques peuvent informer en pratique sur l'échappement thérapeutique et surtout sur les effets toxiques engendrés, souvent graves, qui limitent les bénéfices des traitements.

La mise en évidence, dans le cancer colorectal, de nouveaux marqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs de la réponse (et/ou de la toxicité) à la chimiothérapie, gagne une place importante dans l'optimisation thérapeutique. Dans ce cadre, à travers des deux études cliniques rétrospectives, nous avons orienté nos travaux vers l'analyse des différentes altérations génétiques pouvant expliquer, d'une part, les effets toxiques graves et, d'autre part, les réponses imprévisibles aux chimiothérapies associant les trois molécules de référence (5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine) chez les patients porteurs un cancer colorectal métastatique.

Par ailleurs, le développement d'une résistance aux médicaments anticancéreux de la tumeur pose un problème considérable qui nécessite en conséquence un changement de ligne thérapeutique lorsque c'est possible.

La capacité de réparer l'ADN des cellules tumorales leur confère la résistance aux traitements qui endommagent l'ADN comme les chimiothérapies. Ainsi, la réparation de l'ADN est reconnue comme une cible thérapeutique. Depuis des années, les laboratoires ont caractérisé les protéines clés impliquées dans la voie de détection, signalisation et réparation des dommages de l'ADN. Malgré l'état d'avancement de ces travaux, les anomalies de réponse aux différents agents chimiothérapeutiques liées à des facteurs génétiques restent encore un sujet qui nécessite d'être approfondi afin de trouver leur place au lit du patient.

Dans ce contexte nous avons cherché à démontrer par nos travaux qu'il est possible de définir, dans chaque situation de traitements avec des agents chimiothérapeutiques « classiques », des groupes de patients à risque de toxicité et/ou de mauvais pronostic par

## CHAPITRE 4

l'analyse de polymorphismes sélectionnés sur l'ADN isolé à partir des leucocytes, par simple prélèvement sanguin.

Parallèlement aux combinaisons de chimiothérapies standards que sont l'Irinotécan et l'Oxaliplatine, le développement récent de nouvelles thérapies ciblées, telles que les anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), a permis d'améliorer la survie des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Cependant, ces thérapies ciblées ne permettent pas une réponse tumorale chez tous les patients, le statut tumoral de K-Ras étant le principal facteur limitant de l'efficacité du traitement. De ce fait, la connaissance du statut K-Ras pour la prise en charge des patients avec un cancer colorectal métastatique est devenue incontournable pour définir une stratégie thérapeutique. Les données de l'étude CRYSTAL ont montré que l'association du cetuximab au régime FOLFIRI en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement du cancer colorectal métastatique améliorait significativement le taux de réponse objective (46,9 vs 38,7) et la survie sans progression (34% vs 23%). Toutefois, le bénéfice du cetuximab a été limité aux patients avec des tumeurs K-Ras sauvage [Van Cutsem *et al.*, 2007a ; Van Cutsem *et al.*, 2008]. Concernant le protocole chimiothérapeutique FOLFOX, les résultats ressortant de l'étude OPUS montrent également que les patients avec un statut mutationnel somatique K-Ras sauvage tirent le bénéfice du cetuximab. Par ailleurs, dans le groupe de patients traités avec FOLFOX 4 seul, les patients présentant des mutations de K-Ras semblent avoir une survie sans progression plus grande par rapport à celle des patients avec un statut K-Ras sauvage (8,6 mois vs 7,2 mois) [Bokemeyer *et al.*, 2009]. Etant donné qu'un effet comparable n'a pas été observé dans l'étude CRYSTAL lorsque le cetuximab a été ajouté à FOLFIRI, il est possible que des facteurs génétiques spécifiques au métabolisme de l'Oxaliplatine interagissent avec des voies d'action des thérapies ciblées anti-EGFR. A ce sujet, il a déjà été montré *in vitro* sur cultures cellulaires que l'activation de H-Ras (une isoforme de Ras) est responsable d'une augmentation de l'expression d'ERCC1 et donc d'une augmentation de la résistance cellulaire à l'Oxaliplatine [Young *et al.*, 2004]. Donc ERCC1 pourrait être « l'autre facteur de l'équation » permettant le choix entre le régime FOLFIRI et FOLFOX dans le cas de l'association du cetuximab. Dans ce contexte, nous avons analysé au cours de cette thèse l'expression d'ERCC1 dans des cellules K-Ras sauvage (HT29) et K-Ras muté (HCT116), afin d'évaluer son rôle comme possible cible thérapeutique.

Les résultats ressortissant de ces études seront discutés par la suite.



### **IV.1. L'identification des facteurs génétiques prédictifs pour la résistance et les toxicités à l'Irinotécan et à l'Oxaliplatine**

Malgré les découvertes des dernières années en termes de nouvelles thérapies, la médiane de survie globale des patients avec un cancer colorectal métastatique et aux stades avancés n'est que d'environ 2 ans à l'heure actuelle. De plus, la fréquence de cette maladie avec une incidence exponentielle croissante à partir de 50 ans justifie des efforts de prévention, de dépistage ainsi que d'optimisation thérapeutique afin de proposer les meilleures options thérapeutiques. Concernant spécifiquement l'optimisation des traitements de chimiothérapie existants, la pharmacogénétique comme la pharmacogénomique représentent des voies de recherche primordiales visant « le bon traitement au bon malade et à la bonne dose ».

Utilisé seul ou en association avec d'autres molécules (notamment Irinotécan et Oxaliplatine), le 5-FU a fait, au cours des années, la preuve de son importance clinique dans le traitement du cancer colorectal. Mais dans la plupart des cas, l'utilisation de ces protocoles chimiothérapeutiques ne prend pas en compte les variations interindividuelles dans l'expression de certains gènes pouvant influencer la biodisponibilité des molécules chimiothérapeutiques. Par ailleurs, ces variations individuelles sont dans la plupart des cas à l'origine de la non-efficacité au traitement, mais aussi à l'origine de l'apparition des phénomènes toxiques graves mettant en danger la vie du patient. Dans ce contexte, les stratégies courantes de chimiothérapie ne sont pas optimales, du fait, en partie, de l'impossibilité de distinguer précisément les sous-groupes de patients sensibles ou non au traitement [Mariadason *et al.*, 2004]. Il est reconnu qu'à dose conventionnelle, certains patients, recevant du FOLFIRI (association 5-FU – Irinotécan) par exemple, ne reçoivent pas la dose adéquate des molécules associées.

En conséquence, l'identification de marqueurs génétiques permettant de distinguer ces sous-groupes des patients, dans le but d'augmenter la réponse au traitement, prévenir les toxicités imprévisibles et améliorer la qualité de vie.

Dans le contexte de la prescription des médicaments conventionnels au cours du traitement du cancer colorectal, une partie de notre travail a eu comme objectif d'étudier certains polymorphismes génétiques pouvant représenter des critères moléculaires prédictifs de réponse ou de toxicité aux médicaments tel que 5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine. L'objectif a été de proposer d'emblée un modèle pharmacogénétique, afin d'aider le clinicien dans le meilleur choix thérapeutique pour chaque patient. Cela concerne une optimisation de sa prise

## CHAPITRE 4

en charge, en évitant potentiellement un traitement inutile, toxique et coûteux ou au contraire en le justifiant même au prix d'une toxicité attendue, mais en raison d'un bénéfice évalué comme très probable.

Ainsi, par l'intermédiaire de nos études cliniques représentant une continuation des travaux de recherche réalisés au sein de notre laboratoire, plusieurs observations peuvent être tirées. Dans un premier temps, sur le plan pharmacologique, l'approche combinée de détection pré-thérapeutique par des techniques phénotypiques (rapport UH2/U) et génotypique (pyroséquençage) des mutations de la DPD, secondairement suivie d'une adaptation pharmacocinétique de doses, permet d'excellents taux de réponses et de survie. Ils sont valables tant pour une chimiothérapie à base du 5-FU seul que pour les protocoles FOLFIRI et FOLFOX4, avec l'objectivation dans le même temps thérapeutique de toxicités inférieures en nombre comme en intensité, par rapport à ce qui est habituellement rapporté dans les publications précédentes. Cette constatation confirme donc *l'intérêt de la démarche combinée pharmacogénétique/pharmacogénomique*.

Dans un deuxième temps, concernant l'Irinotécan, *la recherche des mutations de l'UGT1A1 s'avère extrêmement importante car elle influençait le risque de toxicités importantes telles que les diarrhées et les neutropénies*. Dans le même contexte, *la recherche de mutations N129/131K de l'UGT1A7 pourrait également aider à la gestion des toxicités graves de grade 3-4 après un traitement à l'Irinotécan*. La mutation W208R de l'UGT1A7 s'avère-t-elle aussi intéressante. En effet, à notre connaissance, nous avons indiqué pour la première fois que *cette mutation est un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patients*. Une autre observation intéressante issue de cette étude est que l'Irinotécan semble annuler les effets génotypiques des enzymes impliquées dans le métabolisme du 5-FU (notamment le statut de la TS). De même l'existence de cet effet sur les corrélations possibles entre le génotype de la TS 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 mono-chimiothérapie par 5-FU.

Concernant spécifiquement l'Oxaliplatine justement la neurotoxicité aiguë serait liée à des désordres hydroélectriques via les canaux sodiques calcium-dépendants impliquant l'oxalate et possiblement donc l'AGXT. *La toxicité chronique impliquerait plutôt la création des 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 la mutation C118T d'ERCC1 et les patients homozygotes C/C pour la mutation A751C d'XPD 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 vs 8 mois pour les autres groupes). Les populations homozygotes « sauvages » et hétérozygotes pour ces enzymes (C/C et C/T pour C118T d'ERCC1 et A/A et A/C pour A751C d'XPD) pourraient à l'inverse bénéficier d'un traitement intensifié par l'Oxaliplatine, bien qu'il n'y ait pas d'effet-dose cliniquement encore démontré à l'heure actuelle pour l'Oxaliplatine ; ceci dit, la grande prévalence des neurotoxicités et leurs sévérités ont été des facteurs très largement limitatifs dans l'évaluation de ce concept dose-intensité. A notre connaissance, *ERCC1 et XPD sont les premières cibles identifiées concernant la toxicité chronique à l'Oxaliplatine* et pourraient donc être explorées dans des études prospectives d'adaptation de dose.

En conclusion, dans ce travail nous avons isolé de potentiels facteurs moléculaires prédictifs de la réponse aux principaux agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement des cancers colorectaux (notamment Irinotécan et Oxaliplatine). Nous en avons cité d'autres qui joueraient aussi un rôle prédictif dans l'efficacité du traitement. En même temps, les résultats des études rétrospectives doivent être interprétés avec prudence. Il semble difficile d'analyser les effets d'un ou de plusieurs polymorphismes pendant le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique. En effet, de nombreuses interférences, liées à l'état clinique, à des lignes différentes de chimiothérapie et, éventuellement, à la combinaison de thérapies ciblées, peuvent entraîner des confusions statistiques. De plus, s'agissant d'études cliniques rétrospectives et d'effectifs relativement modestes, une puissance statistique suffisante est difficile à atteindre. Malgré cela, nos études semblent pertinentes, avec des cohortes homogènes et avec des analyses des génotypes impliqués dans des voies biologiques indépendantes.

Ainsi, des recherches cliniques prospectives sur de larges populations doivent maintenant être menées pour valider non seulement l'importance des polymorphismes génétiques pour la prédiction de l'efficacité et de la toxicité des médicaments, mais également pour le bénéfice des tests pharmacogénétiques en terme d'économie de santé.

### **IV.2. *ERCC1 et son rôle dans la résistance à l'Oxaliplatine***

La création de lésions au niveau de l'ADN est l'un des principaux mécanismes d'action des médicaments utilisés en chimiothérapie. Les mécanismes de défense de la cellule contre

ces agressions font appel aux différents systèmes de réparation de l'ADN. Ces systèmes interviennent plus ou moins spécifiquement, en fonction du type de lésion. Par exemple, l'un des mécanismes d'acquisition de résistance aux agents thérapeutiques est la surexpression des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN.

Concernant l'action cytotoxique de l'Oxaliplatine, il est possible qu'elle soit liée aux dommages induits d'abord au niveau de l'ADN, mais également au niveau d'expression de l'endonucléase ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementing group 1*). Certaines études relativement récentes ont montré que l'expression de cette protéine hautement conservée [Wilson *et al.* 2001] est inversement corrélée avec la réponse à l'Oxaliplatine [Shirota *et al.*, 2001 ; Arnould *et al.*, 2003]. Par ailleurs, dans la littérature il a été montré que l'expression d'ERCC1 est régulée par l'intermédiaire de Ras [Young *et al.*, 2004].

Pour mieux comprendre son implication dans les mécanismes de résistance à cette molécule anticancéreuse, dans la première partie de cette thèse nous avons évalué le rôle d'ERCC1 dans la survie cellulaire des deux lignées coliques (HT29 et HCT116). Ces deux lignées utilisées au cours de nos études ont été caractérisées au sein de notre laboratoire tant pour le statut mutationnel de l'oncogène K-Ras, mais aussi pour la mutation C118T d'ERCC1. Ainsi les cellules HCT116 présentent la mutation constitutionnelle G13D de K-Ras et un statut muté T/T pour C118T d'ERCC1, tant que les cellules HT29 sont sauvages pour K-Ras et hétérozygotes C/T pour C118T d'ERCC1.

Tout d'abord nous nous sommes intéressés à la localisation cellulaire d'ERCC1, en émettant l'hypothèse que la localisation de cette protéine pourrait influencer la capacité de réparation, donc la résistance au traitement. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que, dans les deux types cellulaires, ERCC1 a été trouvé présente dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules HT29 et HCT116. La localisation d'ERCC1 dans le compartiment cytoplasmique peut s'expliquer par le fait que cette protéine ne contient pas de séquence de localisation nucléaire (NLS) [Boulikas *et al.* 1997]. La localisation nucléaire de cette protéine dépend donc de sa capacité d'interagir avec d'autres protéines du complexe TFIIH, notamment avec XPF qui contient 4 séquences NLS [Boulikas *et al.* 1997]. En même temps, dans les cellules HT29 nous avons aussi constaté une variation transitoire de l'expression de cette protéine, après 48h de stimulation à l'Oxaliplatine, dans les deux compartiments cellulaires. Ces résultats montrent que l'Oxaliplatine provoquerait une translocation nucléaire d'ERCC1 dans ce type cellulaire. En même temps, la présence d'ERCC1 dans le compartiment cytoplasmique peut témoigner le fait que cette protéine joue un rôle important dans la régulation de l'activité de NER.

## CHAPITRE 4

Parallèlement, nous avons évalué la cytotoxicité à l'Oxaliplatine de nos lignées cellulaires, après 48h d'exposition au traitement. Nous avons observé que les cellules HT29 sont sensiblement plus résistantes à cet agent anticancéreux que les cellules HCT116 (*Voir figure III.2 ; pag. 238*). La modulation de la translocation cellulaire d'ERCC1 par l'Oxaliplatine, observée particulièrement dans les deux compartiments cellulaires de HT29, pourrait être une explication possible de la sensibilité plus petite de cette lignée par rapport à celle de l'Oxaliplatine (les valeurs d'IC<sub>50</sub> : 0,51 vs 0,33). Par ailleurs, une efficacité réduite de l'Oxaliplatine dans les cellules HT29 pourrait également être due à une augmentation de l'expression d'ERCC1, tant au niveau de l'ARN qu'au niveau de la protéine.

Toutefois, il a été indiqué que la présence des mutations de Ras peut être responsable d'une augmentation de l'expression d'ERCC1 et donc d'une augmentation de la résistance à l'Oxaliplatine. Dans le cas de cellules HCT116 cette hypothèse ne se vérifie pas. En effet, même si la mutation de l'oncogène Ras existe, la stimulation de l'expression d'ERCC1 par la voie de MAP Kinase (via Ras) n'est pas efficace, car nous n'avons pas remarqué une augmentation de l'expression d'ERCC1 ni au niveau de l'ARN, ni au niveau de la protéine. Nous pouvons considérer que la stimulation basale d'ERCC1 est inhibée probablement par la présence de la mutation C118T d'ERCC1. Il a été prouvé que le polymorphisme au niveau de codon 118 d'ERCC1 semble associé à un niveau d'expression altéré de la protéine ERCC1 [Yu *et al.* 1997 ; Park *et al.* 2001]. En effet, ce polymorphisme est responsable d'une diminution d'expression d'ERCC1 qui entraînera par la suite un système NER moins efficace. Les chimiothérapies provoquant des lésions réparées par le NER seraient alors plus efficaces.

Dans une revue récente sur la pharmacogénomique, il a été souligné que les données concernant ce SNP d'ERCC1 sont contradictoires : l'allèle T a été associée, ou à une diminution de la survie globale [Stoehlmacher *et al.*, 2004], ou à une diminution de la survie sans progression [Ruzzo *et al.*, 2007], mais également à une augmentation du taux de réponse [Viguié *et al.*, 2005]. Ces résultats controversés représentent la preuve que la fonction exacte de ce SNP d'ERCC1 doit faire l'objet d'études de validation autant *in vitro* qu'*in vivo*.

Les données provenant des systèmes *in vitro* ont montré que la suppression de l'expression d'ERCC1 restaure la sensibilité des cellules aux sels de platine [Chang *et al.*, 2005]. Cette constatation justifie notre choix d'étudier l'impact de la surexpression ou d'inhibition de l'expression d'ERCC1 sur la survie à l'Oxaliplatine dans nos lignées cellulaires.

Nos observations, obtenus par des tests de survie à la Sulforhodamine B, ont confirmé qu'une surexpression d'ERCC1 a un impact sur la survie cellulaire après une exposition à l'Oxaliplatine. Effectivement, les cellules présentant un taux d'expression important d'ERCC1 ont moins répondu au traitement (*Voir figure III.9 ; pag. 244*). De manière complémentaire, une suppression de l'expression d'ERCC1, suite à la transfection du siRNA a eu comme résultat une augmentation de l'effet cytotoxique de l'Oxaliplatine, mis en évidence par une diminution de la survie cellulaire.

Nos résultats obtenus dans les deux lignées cellulaires sont aussi en accord avec des observations présentées dans différentes études cliniques *in vivo*. Certaines études rétrospectives ont rapporté que l'évaluation du niveau d'ARNm d'ERCC1 dans les tumeurs prélevées des patients avec de cancer colorectal montre une corrélation inverse avec la réponse au traitement par les platines [Shirota *et al.*, 2001].

Afin d'évaluer l'importance du système de réparation de l'ADN par excision des nucléotides dans le cadre de la sensibilité à l'Oxaliplatine, nous avons analysé par la suite l'expressions d'ARNm de ERCC1, XPF et XPA par RT-PCR.

Il a été montré que les protéines ERCC1, XPF et XPA forment un complexe trimérique qui participe à la reconnaissance des dommages créés au niveau de l'ADN, mais aussi dans le processus d'excision de ces cassures [Park *et al.*, 1994]. Par rapport aux implications de ces protéines dans les phénomènes de résistance à l'Oxaliplatine, certaines travaux de recherche ont mis en évidence le fait que l'expression d'ERCC1, et aussi celle de XPA, sont prédictives d'une sensibilité à l'Oxaliplatine [Arnould *et al.*, 2003]. Cependant, l'existence de ce complexe trimérique souligne la difficulté d'établir des relations étroites entre ces protéines de réparation en particulier, et la résistance à cet agent anticancéreux.

La protéine XPA participe aux étapes précoces de reconnaissance des dommages de l'ADN lorsqu'elle est associée à la RPA (*Replication Protein A*). Elle joue un rôle majeur dans le NER puisqu'il a été illustré que des mutations de XPA qui empêchent l'interaction entre XPA et ERCC1 abolissent la réparation de l'ADN [Li *et al.*, 1995].

Nous avons montré, suite à l'analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR, qu'une surexpression d'ERCC1 est accompagnée aussi d'une augmentation de l'expression d'ARNm notamment de XPA dans deux types cellulaires. De la même façon, nous avons remarqué qu'après l'inhibition de l'expression d'ERCC1 il y a eu aussi une diminution de l'expression d'ARNm de ses partenaires, par rapport à une situation contrôle. Toutefois, il a été observé que le niveau basal de XPA semble être lié au niveau résiduel des adduits créés par l'Oxaliplatine [Arnould *et al.*, 2003]. Dans ce même travail, l'Oxaliplatine induit une

augmentation de l'expression d'ARNm de XPA, augmentation qui a été corrélée avec l'effet cytotoxique de la molécule ( $r^2 = 0,55$  ;  $p = 0,04$ ).

Nos résultats indiquent que la variation de l'expression d'ERCC1 a un effet sur la variation de l'expression d'ARNm de ses partenaires, dans les lignées cellulaires utilisées comme modèle d'étude. Une autre conclusion intéressante qui peut être tirée suite à nos études est que le statut mutationnel somatique de K-Ras semble induire une augmentation importante de l'expression d'ERCC1 suite à la stimulation des cellules à l'Oxaliplatine (*Voir figure III.12 ; pag. 247*). Donc, ce résultat pourrait indiquer l'importance de la connaissance du statut de K-Ras pour prévoir l'efficacité de l'Oxaliplatine.

En conclusion, nos observations peuvent avoir aussi une importante implication thérapeutique. Les résultats ressortant de cette étude confirment qu'il est possible d'envisager des agents qui ciblent ERCC1, dans le but d'augmenter l'efficacité de l'Oxaliplatine et d'inverser la résistance au traitement.

### **IV.3. Recherche des mutations de K-Ras dans les cancers colorectaux**

Nous avons montré suite aux résultats présentés dans le chapitre III.2 que le statut muté de Ras peut être responsable d'une augmentation de l'expression d'ERCC1 après la stimulation des cellules à l'Oxaliplatine. Donc, le statut mutationnel somatique de K-Ras pourrait également influencer l'efficacité d'un régime FOLFOX par une stimulation de l'expression d'ERCC1. Pour mieux cibler les patients afin qu'ils tirent tous les bénéfices d'un tel schéma thérapeutique, la recherche pré-thérapeutique des mutations de K-Ras pourrait être très utile.

Par ailleurs, la recherche des mutations du K-Ras est complexe. De nombreuses technologies différentes sont en cours de développement ou ont été développées pour la détermination du statut mutationnel somatique de K-Ras. Il s'agit des déclinaisons ou des combinaisons de plusieurs techniques (notamment des techniques d'hybridation moléculaire, des techniques d'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ou encore le séquençage d'ADN extrait des tissus tumoraux congelés ou inclus en paraffine), mais avec la remarque qu'elles s'appliquent toutes sur de l'ADN tumoral amplifié par PCR.

Le travail sur l'ADN tumoral implique toutefois des nombreuses difficultés liées notamment à la conservation des tumeurs (congélation ou fixation dans des fixateurs

## CHAPITRE 4

compatibles avec des études de biologie moléculaire), au site tumoral à étudier (tumeur primitive ou métastases), mais aussi au choix de la zone tumorale qui sera amplifiée et à l'obtention d'ADN tumoral de qualité suffisante pour permettre l'amplification du gène et l'identification de la mutation. Pour un résultat satisfaisant, il faut pouvoir analyser un tissu tumoral très riche en cellules tumorales en excluant le maximum de cellules normales.



**Figure IV.1** – Indication des zones avec du tissu sain (TS) et des zones avec du tissu cancéreux (T)

Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'il est possible de rechercher les mutations de K-Ras tant au niveau de la tumeur primitive qu'au niveau des métastases (le statut de K-Ras étant identique dans les deux sites tumoraux) car ces mutations apparaissent très précocement dans la cancérogenèse colorectale et restent identiques au cours de la progression tumorale [Grimaldi *et al.*, 2008].

Un autre problème pratique est lié au nombre limité des cellules tumorales résultant après une biopsie ainsi qu'à la « contamination » de l'échantillon avec des cellules saines. La microdissection laser est une méthode innovante qui pourrait permettre aux laboratoires de recherche et d'anatomie pathologique, de séparer les cellules tumorales des cellules de la stroma. Par ailleurs, cette technique est toutefois délicate et l'équipement nécessaire coûteux. Donc la nécessité de trouver une méthode de détermination pré-thérapeutique des mutations de K-Ras rapide, fiable et pas chère trouve dans ce contexte tout son intérêt.

Dans notre laboratoire, parmi les méthodes utilisées en routine pour la détection des mutations de K-Ras, la technique du pyroséquençage occupe une place importante grâce à sa



rapidité et à sa fiabilité. Dans la dernière partie de cette thèse nous nous sommes proposés d'analyser le seuil minimum de détection des mutations de K-Ras dans un mélange de cellules avec un statut K-Ras non-muté et K-Ras muté, par pyroséquençage. Nos résultats ont montré que le seuil minimum de détection d'allèle muté de K-Ras est d'environ 5% (*Voir figure III.14 et III.15 ; pag. 251*). Ces résultats sont aussi en accord avec les résultats décrits dans la littérature [Dufort *et al.*, 2009]. De plus, cette limite de détection de la technique du pyroséquençage a été également observée au cours de l'étude STIC 1 qui a eu comme but l'analyse du statut mutationnel du K-Ras dans 96 ADN<sub>g</sub> provenant des mélanges cellulaires. En effet, nous avons constaté que les échantillons mutés à 5% ont été moins bien détectés.

Ces résultats ainsi que les données ressortant de la littérature indiquent la nécessité de trouver une méthode encore plus sensible qui pourra permettre la détection des mutations de K-Ras. Par ailleurs, étant donné les difficultés des prélèvements invasifs (nécessaires afin d'extraire l'ADN tumoral) qui sont douloureux et non dénués de risque pour le patient, il est nécessaire de trouver également de nouveaux outils pour étudier de marqueurs moléculaires tumoraux comme K-Ras. Dans ce contexte, des procédures alternatives non invasives sont recherchées depuis de nombreuses années.

La mise en évidence des cellules tumorales circulantes a ouvert des nouvelles perspectives pour la prise en charge du cancer colorectal de manière que l'analyse de l'ADN circulant pourrait permettre tant le diagnostic qu'aussi le suivi de l'évolution tumorale.

L'identification des mutations de l'oncogène Ras dans le plasma des patients atteints d'un cancer du pancréas [Sorenson *et al.*, 1997] ou chez des malades avec un syndrome myélodysplasique [Vasioukhin *et al.*, 1994] a constitué une preuve importante de la possibilité de détection tumorale par l'ADN circulant. De plus, quelques travaux ont montré une augmentation significative du taux d'ADN plasmatique libre au cours de l'évolution des tumeurs incluant les stades précoces. Concernant le cancer colorectal, une étude a montré que l'ADN circulant retrouvé dans le plasma pourrait être aussi un facteur prédictif de récurrence de la maladie [Thijssen *et al.*, 2002]. En vue de ces informations et dans le cas particulier du cancer colorectal, la recherche des mutations de K-Ras dans l'ADN circulant des patients peut représenter un intéressant et prometteur outil de génétique moléculaire pour le suivi de l'évolution tumorale et donc pour le suivi thérapeutique. Cette approche pourrait constituer un outil particulièrement prometteur et peu invasif, puisque le dosage peut s'effectuer sur un prélèvement sanguin limité.

Dans la littérature, quelques travaux de recherche ont montré que la technique MASA (*Mutant Allele Specific Amplification*) est beaucoup plus sensible en ce qui concerne la

## CHAPITRE 4

détection des mutations du K-Ras par rapport à d'autres méthodes d'analyse [Takeda *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 1989 ; Tobi *et al.*, 1994 ; Tada *et al.*, 1993]. En effet, cette technique pourra permettre la détection de 0,1ng/μl d'ADN muté dans 1μg d'ADN non-muté [Yamada *et al.*, 1998]. Cette observation rend cette technique extrêmement sensible. Toutefois, la mise en œuvre systématique est difficile et reste encore du demain de la recherche, mais elle mérite d'être approfondie.

## Bibliographie

Aaltonen, L.; Peltomäki, P.; Mecklin, J.; Järvinen, H.; Jass, J.; Green, J.; Lynch, H.; Watson, P.; Tallqvist, G. & Juhola, M. (1994), 'Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients', *Cancer Res.* **54**(7), 1645-8.

Adewole, I.; Benedet, J.; Crain, B. & Follen, M. (2005), 'Evolving a strategic approach to cervical cancer control in Africa', *Gynecol Oncol* **99**, S209-12.

Agarwal, R. & Kaye, S. (2003), 'Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy', *Nat Rev* **3**, 502-16.

Akawi, Z. E.; Hadid, M. A.; Perez, R.; Glavy, J.; Zdanowicz, J.; Creaven, P. & Pendyala, L. (1996), 'Altered glutathione metabolism in oxaliplatin resistant ovarian carcinoma cells', *Cancer Lett* **105**, 5-14.

Ali-Osman, F.; Akande, O.; Antoun, G.; Mao, J. & Buolamwini, J. (1997), 'Molecular cloning, characterisation and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase pi variants. evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins', *J. Biol. Chem* **272**, 10004-11112.

Allan, J.; Smith, A.; Weatley, K.; Hills, R.; Travis, L.; Hill, D.; Swirky, M.; Morgan, G. & Wild, C. (2004), 'Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy', *Blood* **104**, 3872-3877.

Allikmets, R.; Schriml, L.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V. & Dean, M. (1998), 'A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.', *Cancer Res.* **58**(23), 5337-5339.

Andersen, S.; Løvig, T.; Breivik, J.; Lund, E.; Gaudernack, G.; Meling, G. & Rognum, T. (1997), 'K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas', *Scand J Gastroenterol* **32**(1), 62-9.

Ando, M.; Ando, Y.; Sekido, Y.; Ando, M.; Shimokata, K. & Hasegawa, Y. (2002), 'Genetic polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase 1A7 gene and irinotecan toxicity in Japanese cancer patients', *Jpn J Cancer Res.* **93**(5), 591-7.

Ando, Y.; Saka, H.; Ando, M.; Sawa, T.; Muro, K.; Ueoka, H.; Yokoyama, A.; Saitoh, S.; Shimokata, K. & Hasegawa, Y. (2000), 'Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis.', *Cancer Res.* **60**(24), 6921-6.

Andoh, T.; Ishii, K.; Suzuki, Y.; Ikegami, Y.; Kusunoki, Y.; Takemoto, Y. & Okada, K. (1987), 'Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I.', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(16), 5565-9.

Andreyev, H.; Norman, A.; Cunningham, D.; Oates, J. & Clarke, P. (1998), 'Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer : the multicenter "RASCAL" study.', *J Natl Cancer Inst* **90**, 675-84.

André, T.; Boni, C.; Mounedji-Boudiaf, L. & et. al (2004), 'Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators.', *N Engl J Med.* **350**(23), 2343-51.

Aparicio, T.; Ducreux, M. & Chaussade, S. (2002), '5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs.', *Gastroenterol Clin Biol* **26**, 38-47..

Arnould, S.; Hannebelle, I.; Canal, P.; Bugat, R. & Guichard, S. (2003), 'Cellular determinants of oxaliplatin

## Bibliographie

sensitivity in colon cancer cell lines', *Eur J Cancer* **39**, 112-9.

Aschele, C.; Debernardis, D.; Casazza, S.; Antonelli, G.; Tunesi, G.; Baldo, C.; Lionetto, R.; Maley, F. & Sobrero, A. (1999), 'Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy', *J Clin Oncol.* **17**(6), 1760-70.

Aschele, C.; Debernardis, D.; Tunesi, G.; Maley, F. & Sobrero, A. (2000), '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.* **6**(12), 4797-802.

Aschele, C.; Lonardi, S. & Monfardini, S. (2002), 'Thymidylate Synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer.', *Cancer Treat Rev.* **28**(1), 27-47..

Bariol, C.; Suter, C.; Cheong, K. & et al. (2003), 'The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia.', *Am J Pathol* **162**, 1361 – 71.

Bergmann, E. & Egly, J. (2001), 'Tricothiodystrophy, a transcription syndrome', *Trends Genet* **17**, 279-86.

Bertilsson, G.; Heidrich, J.; Svensson, K.; Åsman, M.; Jendeberg, L.; Sydow-Backman, M.; Ohlsson, R.; Postlind, H.; Blomquist, P. & Berkenstam, A. (1998), 'Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction.', *Biochemistry, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12208–12213.

Beutler, E. (1993), 'Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology.', *Am J Hematol.* **42**(1), 53-8.

Beutler, E.; Gelbart, T. & Demina, A. (1998 ), 'Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? ', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(14), 8170-8174.

Blount, B.; Mack, M.; Wehr, C. & et al. (1997), 'Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3290 – 5.

Blumberg, B.; Jr., W. S.; Juguilon, H.; Jr., J. B.; Meter, C. V.; Ong, E. & Evans, R. (1998), 'SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor.', *Genes & Dev.* **12**, 3195-3205.

Board, P.; Baker, R.; Chelvanayagam, G. & Jermiin, L. (1997), 'Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans', *Biochem J.* **328**, 929-35.

Boige, V.; Mendiboure, J.; Pignon, J.; Lorient, M.; Castaing, M.; Barrois, M.; Malka, D.; Trégouët, D.; Bouché, O.; Corre, D. L.; Miran, I.; Mulot, C.; Ducreux, M.; Beaune, P. & Laurent-Puig, P. (2010), 'Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05.', *J Clin Oncol.* **28**(15), 2556-64.

Bosma, P. (2003), 'Inherited disorders of bilirubin metabolism', *J. Hepatol* **38**, 107-117.

Bosma, P.; Chowdhury, J.; Bakker, C.; Gantla, S.; de Boer, A.; Oostra, B.; Lindhout, D.; Tytgat, G.; Jansen, P.; Oude Elferink, R. & et al. (1995), 'The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome.', *N Engl J Med.* **333**(18), 1171-5.

Boulikas, T. (1993), 'Nuclear localization signals (NLS).', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **3**(3), 193-227.

Bouvier, A.; Remontet, L.; Jouglu, E.; Launoy, G.; Grosclaude, P.; Buémi, A.; Tretarre, B.; Velten, M.; Dancourt, V.; Menegoz, F.; Guizard, A.; Lesec'h, J. M.; Peng, J.; Bercelli, P.; Arveux, P.; Estève, J. & Faivre, J. (2004), 'Incidence of gastrointestinal cancers in France', *Gastroenterol Clin Biol.* **28**(10 Pt 1), 877-81.

Boyer, T. & Kenney, W. (1985), 'Preparation, characterisation and properties of glutathione S-transferases', *Biochemical pharmacology and toxicology.*

## Bibliographie

- Buschta-Hedayat, N.; Buterin, T.; Hess, M.; Missura, M. & Naegeli, N. (1999), 'Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA', *Proc. Natl Acad. Sci.* **96**, 6090-6095.
- Butkiewicz, D.; Rusin, M. & Harris, C. (2000), 'Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in a Polish population', *Human Mutat* **15**, 577-8.
- Campalans, A.; Marsin, S.; Nakabeppu, Y.; O'connor, T.; Boiteux, S. & Radicella, J. (2005), 'XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair', *DNA Repair (Amst)*. **4**(7), 826-35.
- Camptosar (2003), 'Monographie', *Phitzer, Canada*.
- Capitain, O.; Boisdron-Celle, M.; Poirier, A.; Abadie-Lacourtoisie, S.; Morel, A. & Gamelin, E. (2007), 'The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer', *Pharmacogenomics J.* **8**(4), 256-67.
- Carlini, L.; Meropol, N.; Bever, J.; Andria, M.; Hill, T.; Gold, P.; Rogatko, A.; Wang, H. & Blanchard, R. (2005), 'UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan.', *Clin Cancer Res.* **11**(3), 1226-36..
- Cascinu, S.; Aschele, C.; Barni, S.; Debernardis, D.; Baldo, C.; Tunesi, G.; Catalano, V.; Staccioli, M.; Brenna, A.; Muretto, P. & Catalano, G. (1999), 'Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil.', *Clin Cancer Res.* **5**(8), 1996-9..
- Cavaletti, G.; Tredici, G.; Petruccioli, M.; Dondè, E.; Tredici, P.; Marmiroli, P.; Minoia, C.; Ronchi, A.; Baysas, M. & Etienne, G. (2001), 'Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat.', *Eur J Cancer.* **37**(18), 2457-63.
- Cecchin, E.; Innocenti, F.; D'Andrea, M.; Corona, G.; Mattia, E. D.; Biondi, P.; Buonadonna, A. & Toffoli, G. (2009), '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', *Journal of Clinical Oncology* **27**(15), 2456-2465.
- Chabot, G.; Robert, J.; Lokiec, F. & Canal, P. (1998), 'Irinotecan pharmacokinetics.', *Bull Cancer.*, 11-20.
- Chaney, S. (1995), 'The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand', *Int J Oncol* **6**, 1291-1305.
- Chang, I.; Kim, M.; Kim, H.; Lee, D.; Kim, S.; Kim, H. & You, H. (2005), 'Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin', *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 225-33.
- Chang, J.; Liu, J.; Juang, S.; Liu, T. & Chen, L. (2002), 'Novel mutation of topoisomerase I in rendering cells resistant to camptothecin.', *Cancer Res.* **62**(13), 3716-21.
- Chang, P.; Tzeng, C.; Chen, P.; Lin, J.; Lin, T.; Chen, W.; Jiang, J.; Wang, H. & Wang, W. (2008), '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.* [Epub ahead of print].
- Chao, C.; Huang, Y.; Ma, C.; Chou, W. & Lin-Chao, S. (1992), 'Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in multidrug-resistant human colon cancer cell line', *Mol Pharmacol* **43**, 685-93.
- Chen, P.; Wiencke, J.; Aldape, K.; Kesler-Diaz, A.; Miike, R.; Kesley, K. & et al. (2000), 'Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 843-7.
- Cheng, Z.; Radominska-Pandya, A. & Tephly, T. (1998), 'Cloning and expression of human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A8', *Arch Biochem Biophys* **356**, 301-305.
- Chevenix-Trench, G.; Young, J.; Coggan, M. & Board, P. (1995), 'Glutathion S-transferase M1 and T1

## Bibliographie

polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset', *Carcinogenesis* **16**, 1655-1657.

Chipchase, M.; O'Neil, M. & Melton, D. (2003), 'Characterization of premature liver polyploidy in DNA repair (ERCC1)-deficient mice', *Hepatology* **38**, 958-66.

Cho, K. & Vogelstein, B. (1992), 'Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence', *J Cell Biochem Suppl.* **16G**, 137-41.

Choy, E.; Chiu, V.; Silletti, J.; Feoktistov, M.; Morimoto, T.; Michaelson, D.; Ivanov, I. & Philips, M. (1999), 'Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi.', *Cell.* **98**(1), 69-80.

Chrencik, J. E.; Stacker, B. L.; Burgi, A. B.; Pourquier, P.; Pommier, Y.; Stewart, L. & Redinbo, M. R. (2004), 'Mechanisms of Camptothecin Resistance by Human Topoisomerase I Mutations.', *J. Mol. Biol.* **339**, 773-784.

Chu, E.; Koeller, D.; Casey, J.; Drake, J.; Chabner, B.; Elwood, P.; Zinn, S. & Allegra, C. (1991), 'Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase.', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(20), 8977-81.

Chu, E.; Koeller, D.; Casey, J.; Drake, J.; Chabner, B.; PC, P. E.; Zinn, S. & Allegra, C. (1991), 'Use of pyrosequencing to detect clinically relevant polymorphism in dihydropyrimidine dehydrogenase', *Proc Natl Acad Sci U S A* **20**(88), 8977-81.

Chua, W.; Goldstein, D.; Lee, C.; Dhillon, H.; Michael, M.; Mitchell, P.; Clarke, S. & Iacopetta, B. (2009), 'Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer.', *Br J Cancer.* **101**(6), 998-1004.

Ciotti, M.; Lakshmi, V. M.; Basu, N.; Davis, B. B.; Owens, I. S. & Zenser, T. V. (1999), 'Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides', *Carcinogenesis* **20**(10), 1963-9.

Clarkson, S. & Wood, R. (2005), 'Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal', *DNA Repair* **4**, 1068-1074.

Cleaver, J. (2005), 'Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair', *Nat Rev* **5**, 564-573.

Cohen, V.; Panet-Raymond, V.; Sabbaghian, N. & et al. (2003), 'Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidinebased chemotherapy.', *Clin Cancer Res* **9**, 1611-5.

Coin, F.; Marinoni, J.; Rodolfo, C.; Fribourg, S.; Pedrini, A. & Egly, J. (1998), 'Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and p44 subunit of TFIIH', *Nat. Genet* **20**, 184-188.

Colicelli, J. (2004), 'Human RAS superfamily proteins and related GTPases.', *Sci STKE.* **2004**(250), RE13..

Collie-Duguid, E.; Etienne, M.; Milano, G. & McLeod, H. (2000), 'Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients', *Pharmacogenetics.* **10**(3), 217-23.

Cooper, P.; Nouspikel, T.; Clarkson, S. & Leadon, S. (1997), 'Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G', *Science* **275**(5302), 990-3.

Cutsem, E. V.; Lang, I.; Haens, G.; Moiseyenko, V.; Zaluski, J.; Folprecht, G.; Tejpar, S.; Nippgen, J.; Stroh, C. & Rougier, P. (2008), 'KRAS status and efficacy in the CRYSTAL study: 1st-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer receiving FOLFIRI with or without cetuximab.', *Ann Oncol* **19**, viii44-viii46.

Cutsem, E. V.; Nowacki, M.; Lang, I.; Cascinu, S.; Shchepotin, I.; Maurel, J.; Rougier, P.; Cunningham, D.; Nippgen, J. & Kohne, C. (2007), 'The CRYSTAL trial: Efficacy and safety of irinotecan and 5-FU/FA with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer.', *J Clin Oncol* **25**.

Cutsem, E. V.; Peeters, M.; Siena, S.; Humblet, Y.; Hendlisz, A.; Neyns, B.; Canon, J.; Laethem, J. V.; Maurel,

## Bibliographie

- J.; Richardson, G.; Wolf, M. & Amado, R. (2007), '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.* **25**(13), 1658-64.
- Cvitkovic, E. (1998), 'Ongoing and unsaid on oxaliplatin: The hope', *Br J Cancer* **77**, 8–11.
- Dabholkar, M.; Berger, M.; Vionnet, J. & et al. (1995), 'Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns for ERCC1 and ERCC2', *Cancer Res* **55**, 1261-1266.
- Danenberg, P. V. (1977), 'Thymidylate synthase – a target enzyme in cancer chemotherapy', *Biochim biophys Acta* **473**, 73-92.
- Davies, M.; Johnston, P.; Kaur, S. & Allen-Mersh, T. (1999), 'Colorectal liver metastasis thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine.', *Clin Cancer Res.* **5**(2), 325-8..
- Deakin, M.; Elder, J.; Hendrickse, C.; Peckham, D.; Baldwin, D.; Pantin, C.; Wild, N.; Leopard, P.; Bell, D.; Jones, P.; Duncan, H.; Brannigan, K. & Fryer, A. (1996), 'Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancer', *Carcinogenesis* **17**, 881-884.
- Diasio, R.; Beavers, T. & Carpenter, J. (1988), 'Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity', *J Clin Invest.* **81**(1), 47-51.
- Diasio, R. & Harris, B. (1989), 'Clinical pharmacology of 5-fluorouracil.', *Clin. Pharmacokinet* **16**, 1653-64..
- Dikovskaya, D.; Schiffmann, D.; Newton, I.; Oakley, A.; Kroboth, K.; Sansom, O.; Jamieson, T.; Meniel, V.; Clarke, A. & Näthke, I. (2007), 'Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis', *J Cell Biol.* **176**(2), 183-95.
- Dip, R.; Camenisch, U. & Naegeli, H. (2004), 'Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair', *DNA Repair (Amst)* **3**(11), 1409-23.
- Dorne, J. (2004), 'Impact of inter-individual differences in drug metabolism and pharmacokinetics on safety evaluation.', *Fundam Clin Pharmacol* **18**(6), 609-620..
- Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Watson, P. & Murphy, L. (1999), 'The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue', *Clin Cancer Res.* **5**(8), 2103-7.
- Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K. & Ross, D. D. (1998), 'Multidrug resistance transporters from human MCF-7 breast cancer cells. ', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 15665-15670.
- Dresser, G.; Spencer, J. & Bailey, D. (2000), 'Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition', *Clin Pharmacokinet* **38**, 41-57.
- Duell, E.; Wiencke, J.; Cheng, T. & et al (2000), 'Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells.', *Carcinogenesis* **21**, 965-971.
- Duell, E.; Wiencke, J.; Cheng, T.; Varkonyi, A.; Zuo, Z.; Ashok, T.; Mark, E.; Wain, J.; Christiani, D. & Kelsey, K. (2000), 'Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells', *Carcinogenesis* **21**(5), 965-71.
- Dufort, S.; Richard, M. & Fraipont, F. D. (2009), 'Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues', *Anal Biochem.* **27**.
- Duval, A. & Hamelin, R. (2002), 'Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability', *Cancer Res.* **62**(9), 2447-54.
- Ellegren, H. (2004), 'Microsatellites: simple sequences with complex evolution', *Nat Rev Genet.* **5**(6), 435-45.

## Bibliographie

- Etienne, M.; Chazal, M.; Laurent-Puig, P.; Magné, N.; Rosty, C.; Formento, J.; Francoual, M.; Formento, P.; Renée, N.; Chamorey, E.; Bourgeon, A.; Seitz, J.; Delperro, J.; Letoublon, C.; Pezet, D. & Milano, G. (2002), 'Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses.', *J Clin Oncol.* **20**(12), 2832-43..
- Etienne, M.; Formento, J.; Chazal, M. & et al. (2004), 'Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients.', *Pharmacogenetics* **14**, 1-8.
- Etienne, M. C.; Lagrange, J. L.; Dassonville, O.; Fleming, R.; Thyss, A.; Renee, N.; Schneider, M.; F, F. D. & Milano, G. (1994), 'Population study of dihydropyrimidine in cancer patients ', *J Clin Oncol.* **12**, 2248-2253.
- Etienne-Grimaldi, M.; Francoual, M.; Formento, J. & Milano, G. (2007), 'Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and fluorouracil-based treatments in colorectal cancer', *Pharmacogenomics J* **8**, 1561-1566.
- Etienne-Grimaldi, M.; M., F.; J., F.; P., F.; N., R.; P., L.-P.; M., C.; J., D.; C., L.; D., P. & G., M. (2008), 'K-ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine (FU) therapy.', *Gastrointestinal Cancers Symposium*.
- Etienne-Grimaldi, M.; Milano, G.; Maindrault-Goebel, F.; Chibaudel, B.; Formento, J.; Francoual, M.; Lledo, G.; André, T.; Mabro, M.; Mineur, L.; Flesch, M.; Carola, E. & de Gramont, A. (2010), 'Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients.', *Br J Clin Pharmacol.* **69**(1), 58-66.
- Evans, E.; Moggs, J.; Hwang, J. & Wood, R. (1997), 'Mecanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors', *EMBO J.* **16**, 6559-73.
- Evans, W. E. & Johnson, J. A. (2001), 'Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response', *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2**, 9-39.
- Evans, W. E. & Relling, M. V. (1999 ), 'Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. ', *Science* **286**(5439), 487-91.
- Faivre, S.; Chana, D.; Salinasb, R.; Woynarowskab, B. & Woynarowski, J. M. (2003), 'DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells', *Biochemical Pharmacology* **66**, 225–237.
- Fan, F.; Liu, C.; Tavare, S. & Arnheim, N. (1999), 'Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF', *Mutant Res* **406**, 115-20.
- Farrugia, D.; Ford, H.; Cunningham, D.; Danenberg, K.; Danenberg, P.; Brabender, J.; McVicar, A.; Aherne, G.; Hardcastle, A.; McCarthy, K. & Jackman, A. (2003), 'Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed.', *Clin Cancer Res.* **9**(2), 792-801.
- Favy, D.; Lafarge, S.; Rio, P.; Vissac, C.; Bignon, Y. & Bernard-Gallon, D. (2000), 'Real-time PCR quantification of full-length and exon 11 spliced BRCA1 transcripts in human breast cancer cell lines.', *Biochem Biophys Res Commun* **274**(1), 73-8.
- Ferry, K.; Hamilton, T. & Johnson, S. (2000), 'Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF', *Biochem Pharmacol* **60**, 1305-1313.
- Fink, L.; Seeger, W.; Ermert, L.; Hänze, J.; Stahl, U.; Grimminger, F.; Kummer, W. & Bohle, R. (1998), 'Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking.', *Nat Med.* **4**(11), 1329-33.
- Fischel, J.; Formento, P.; Ciccolini, J.; Rostagno, P.; Etienne, M.; Catalin, J. & Milano, G. (2002), 'Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity', *Br J Cancer* **86**(7), 1162-8..
- Fishel, R.; Lescoe, M.; Rao, M.; Copeland, N.; Jenkins, N.; Garber, J.; Kane, M. & Kolodner, R. (1994), 'The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer.', *Cell.* **77**(1), 167.



## Bibliographie

- Fisher, M.; Paine, M.; Strelevitz, T. & Wrighton, S. (2001), 'The role of hepatic and extrahepatic UDP-Glucuronosyltransferase in human drug metabolism', *Drug Metab* **33**, 273-297.
- Fleisher, A.; Esteller, M.; Tamura, G.; Rashid, A.; Stine, O.; Yin, J.; Zou, T.; Abraham, J.; Kong, D.; Nishizuka, S.; James, S.; Wilson, K.; Herman, J. & SJ., S. M. (2001), 'Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia', *Oncogene* **20**(2), 329-35.
- Fleming, R.; Milano, G.; Thyss, A.; Etienne, M.; Renée, N.; Schneider, M. & Demard, F. (1992), 'Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients', *Cancer Res.* **52**(10), 2899-902.
- Fontana, X.; Peyrotte, I.; Valente, E.; Rossi, C.; Ettore, F.; Namer, M. & Bussière, F. (1997), 'Glutathion S-transférase mu1 (GSTM1): gène de susceptibilité du cancer du sein', *Bulletin du Cancer* **84**, 35-40.
- Fortini, P.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; D'Errico, M.; Simonelli, V. & Dogliotti, E. (2003), 'The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility', *Biochimie* **85**(11), 1053-71.
- Frigola, J.; Sole, X.; Paz, M. & et al. (2005), 'Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer.', *Hum Mol Genet* **14**, 319 – 26.
- Fukuen, S.; Fukuda, T.; Matsuda, H.; Sumida, A.; Yamamoto, I.; Inaba, T. & Azumaa, J. (2002), 'Identification of the novel splicing variants for the hPXR in human livers.', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298**, 433–438.
- Gagne, J. F.; Montminy, V.; Belanger, P.; Journault, K.; Gaucher, G. & Guillemette, C. (2002), 'Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38).', *Mol Pharmacol.* **62**(3), 608-617.
- Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M.; Delva, R.; Regimbeau, C.; Cailleux, P.; Alleaume, C.; Maillet, M.; Goudier, M.; Sire, M.; Person-Joly, M.; 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. (1998), '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* **16**(4), 1470-1478.
- Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M.; Guérin-Meyer, V.; Delva, R.; Lortholary, A.; Genevieve, F.; Larra, F.; Ifrah, N. & Robert, J. (1999), '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* **17**(4), 1105.
- Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M. & Morel, A. (2004), 'Journée de Recherche Clinique et de Pharmacologie Oncologique', *John Libbey Eurotext Paris* ©, 155-157.
- Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M. & Morel, A. (2007), 'Detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency before treatment by fluoropyrimidines', *Thérapie* **62**(2), 99-103.
- Gamelin, E.; Boisdron-Celle, M. & Morel, A. (2005), 'Pharmacogénétique du métabolisme des pyrimidines. La dihydropyrimidine déshydrogénase', *Medecine* **7**(1), 33-39.
- Gamelin, E.; Delva, R.; Jacob, J.; Merrouche, Y.; Raoul, J.; Pezet, D.; Dorval, E.; Piot, G.; Morel, A. & Boisdron-Celle, M. (2008), 'Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer.', *J Clin Oncol.* **26**(13), 2099-105.
- Gamelin, L.; Capitain, O.; Morel, A.; Dumont, A.; Traore, S.; Anne, B.; Gilles, S.; Boisdron-Celle, M. & E., E. G. (2007), 'Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway.', *Clin Cancer Res* **13**(1), 6359-68.
- Gardner-Stephen, D.; Heydel, J. M.; Goyal, A.; Lu, Y.; Xie, W.; Lindblom, T.; Mackenzie, P. & Radominska-Pandya, A. (2004), 'Human PXR Variants and Their Differential Effects on The Regulation Of Human UDP-

## Bibliographie

Glucuronosyltransferase Gene Expression', *Drug Metabolism and Disposition* **32**(3), 340–347.

Ghirardi, O.; Giudice, P. L.; Pisano, C.; Vertechy, M.; Bellucci, A.; Vesci, L.; Cundari, S.; Miloso, M.; Rigamonti, L.; Nicolini, G.; Zanna, C. & Carminati, P. (2005), 'Acetyl-L-Carnitine prevents and reverts experimental chronic neurotoxicity induced by oxaliplatin, without altering its antitumor properties', *Anticancer Res.* **25**(4), 2681-7.

Goekkurt, E.; Al-Batran, S. E.; Hartmann, J. T.; Mogck, U.; Schuch, G.; Kramer, M.; Jaeger, E.; Bokemeyer, C.; Ehninger, G. & Stoehlmacher, J. (2009), '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', *Journal of Clinical Oncology*, 1-17.

Goekkurt, E.; Hoehn, S.; Wolschke, C. & et al. (2006), 'Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS): Novel predictors for response and survival in gastric cancer patients.', *Br J. Cancer* **94**, 281-286.

Goldberg, R.; Sargent, D.; Morton, R.; Fuchs, C. & et al. (2004), 'A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer', *J Clin Oncol.* **22**(1), 23-30.

Gossage, L. & Madhusudan, S. (2007), 'Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer', *Cancer Treatment Reviews* **33**, 565-577.

Goto, S.; Iida, T.; Cho, S.; Oka, M.; Kohno, S. & Kondo, T. (1999), 'Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cell lines', *Free Radic Res* **31**, 549-58.

Goto, S.; Kamada, K.; Soh, Y.; Ihara, Y. & Kondo, T. (2002), 'Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs', *Jpn J Cancer Res* **93**(9), 1047-56.

Gottesman, M.; Fojo, T. & Bates, S. E. (2002), 'Multidrug resistance in cancer : role of ATP-dependent transporters', *Nature Reviews Cancer.* **2**, 48-58.

Graham, M.; Lockwood, G.; Greenslade, D.; Brienza, S.; Bayssas, M. & Gamelin, E. (2000), 'Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review', *Clin Cancer Res* **6**(4), 1205-18.

de Gramont, A.; Figer, A.; Seymour, M.; Homerin, M. & et al. (2000), 'Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.', *J Clin Oncol.* **18**(16), 2938-47.

Grothey, A. & Sargent, D. (2005), 'Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line.', *J Clin Oncol* **23**, 9441-2.

Grothey, A.; Sargent, D.; Goldberg, R. & Schmoll, H. (2004), '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* **22**, 1209-1214.

Guillemette, C. (2003), 'Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes', *Pharmacogenomics J.* **3**(3), 136-58.

Guillemette, C.; Ritter, J. K.; Auyeung, D. J.; Kessler, F. K. & Housman, D. E. (2000), 'Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene.', *Pharmacogenetics.* **10**(7), 629-44.

Gupta, E.; Lestingi, T. M.; Mick, R.; Ramirez, J.; Vokes, E. E. & Ratain, M. J. (1994), 'Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea.', *Cancer Res.* **54**(14), 3723-5.

Han, J.; Lim, H.; Yoo, Y. & et al. (2007), 'Association of ABCB1, ABCC2 and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer', *Cancer* **110**, 138-47.

## Bibliographie

- Hansen, R.; Sørensen, M.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Wallin, H.; Raaschou-Nielsen, O. & Vogel, U. (2007), 'XPA A23G, XPC Lys939Gln, XPD Lys751Gln and XPD Asp312Asn polymorphisms, interactions with smoking, alcohol and dietary factors, and risk of colorectal cancer', *Mutat Res.* **619**(1-2), 68-80.
- Harris, S. D. & Pringle, J. R. (1991 ), 'Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I: on the role of mutagen specificity in delimiting the set of genes identifiable using temperature-sensitive-lethal mutations.', *Genetics* **127**(2), 279-285.
- Hayes, J. & Pulford, D. (1995), 'The glutathione S-transferase supergene family : regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.', *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**, 445-600.
- Hector, S.; Bolanowska-Higdon, W.; Zdanowicz, J.; Hitt, S. & Pendyala, L. (2001), 'In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance.', *Cancer Chemother Pharmacol* **48**, 398-406.
- Henning, K.; Li, L.; Iyer, N.; McDaniel, L.; Reagan, M.; Legerski, R.; Schultz, R.; Stefanini, M. & et al. (1995), 'The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH', *Cell* **82**, 555-564.
- Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Holden, K. G.; Jakas, D. R.; Gallagher, G.; Mattern, M. R.; Mong, S. M.; Bartus, J. O.; Johnson, R. K. & Kingsbury, W. D. (1989 ), 'Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity', *J Med Chem.* **32**(3), 715-720.
- Horie, N.; Aiba, H.; Oguro, K.; Hojo, H. & Takeishi, K. (1995), '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* **20**, 191-7..
- Hoskins, J.; Goldberg, R.; Qu, P.; Ibrahim, J. & McLeod, H. (2007), 'UGT1A1\*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Dose Matters', *J Natl Cancer Inst* **99**, 1290 –5.
- Houghton, P. J. H. J. A.; Hazelton, B. J. & Radparvar, S. (1989 ), 'Biochemical mechanisms in colon xenografts: thymidylate synthase as a target for therapy. ', *Invest New Drugs.* **1**(1), 59-69.
- Hoy, C.; Thompson, L.; Mooney, C. & Salazar, E. (1985), 'Defective cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bisfunctional alkylating agents', *Cancer Res* **45**, 1737-1743.
- Hsiang, Y.; Hertzberg, R.; Hecht, S. & Liu, L. (1985), 'Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.', *J Biol Chem.* **260**(27), 14873-8.
- Hu, J.; Smith, T.; Miller, M.; Mohrenweiser, H.; Golden, A. & Case, L. (2001), 'Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity', *Carcinogenesis* **22**(6), 917-22.
- Hu, Z.; Wei, Q.; Wang, H. & Shen, H. (2004), 'DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis', *Lung Cancer* **46**, 1-10.
- Huang, Y.; Han, S.; Li, Y.; Mao, Y. & Xie, Y. (2007), 'Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis.', *J Hum Genet* **52**, 73 – 85.
- Hubner, R. & Houlston, R. (2007), 'MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations.', *Int J Cancer* **120**, 1027 – 35.
- Hum, D. W.; Bélanger, A. & Lévesque, E. (1999), 'Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones ', *J Steroid Biochem Mol Biol* **69 (suppl)**, 413-23..
- Hung, R.; Hall, J.; Brennan, P. & Boffetta, P. (2005), 'Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review', *Am J Epidemiol.* **162**(10), 925-42.
- Hustert, E.; Zibat, A.; Presecan-Siedel, E.; Eiselt, R.; Mueller, R.; Fuß, C.; Brehm, I.; Brinkmann, U.; Eichelbaum, M.; Wojnowski, L. & Burk, O. (2001), 'Natural Protein Variants Of Pregnane X Receptor With

## Bibliographie

- Altered Transactivation Activity Toward CYP3A4.', *Drug Metabolism and Disposition* **29** (11), 1454-1459.
- Iba, T.; Yagi, Y.; Kidokoro, A.; Ishi, K. & Koyatsu, J. (1998 ), 'The intratumoral levels of thymidylate synthetase and folate in gastric and colon cancer', *Gan To Kagaku Ryoho* **25**(8), 1165-71.
- Imai, Y.; Nakane, M.; Kage, K.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Miki, Y. & Sugimoto, Y. (2002 ), 'C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance', *Mol Cancer Ther.* **1**(8), 611-616.
- Ingraham, H.; Tseng, B. & Goulian, M. (1982), 'Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine.', *Mol Pharmacol.* **21**(1), 211-6..
- Innocenti, F.; Undevia, S.; Iyer, L.; Chen, P.; Das, S.; Kocherginsky, M.; Karrison, T.; Janisch, L.; Ramírez, J.; Rudin, C.; Vokes, E. & Ratain, M. (2004), 'Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan.', *J Clin Oncol.* **22**(8), 1382-8.
- Inokuchi, M.; Uetake, H.; Shiota, Y.; Yamada, H.; Tajima, M. & Sugihara, K. (2004), 'Gene expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis.', *Cancer Chemother Pharmacol.* **53**(5), 391-6..
- Iyanagi, T.; Haniu, M. & Sogawa, K. (1986), 'Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for UDP-glucuronosyltransferase', *J Biol Chem* **261**, 15607-15614.
- Iyer, L.; Das, S.; Janisch, L.; Wen, M.; Ramirez, J.; Karrison, T.; Fleming, G. F.; Vokes, E. E.; Schilsky, R. L. & Ratain, M. J. (2002), 'UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity', *Pharmacogenomics J.* **2**(1), 43-47.
- Iyer, L.; Hall, D.; Das, S.; Mortell, M.; Ramirez, J.; Kim, S.; Rienzo, A. D. & Ratain, M. (1999), 'Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism', *Clin Pharmacol Ther* **65**, 576-582.
- Iyer, L.; King, C.; Whittington, P.; Green, M.; Roy, S.; Tephly, T.; Coffman, B. & Ratain, M. (1998), '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 Invest* **101**, 847-854.
- Jacobson, S.; Alberts, S. & Goldberg, R. (2002), 'Oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. In : Colorectal cancer: multimodality Management', *Human Press*, 525-66.
- Jakobsen, A.; Nielsen, J.; Gyldenkerne, N. & et al (2005), 'Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity.', *J Clin Oncol* **23**, 1365-1369.
- Jaspers, N.; Raams, A.; Silengo, M.; Wijgers, N.; Robinson, A. & et al. (2007), 'Firs reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe development failure', *Am. J Hum Genet* **80**, 457-66.
- Jedlischky, G.; Cassiday, A.; Sales, M.; Pratt, N. & Burchell, B. (1999), 'Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-Glucuronosyltransferase', *Biochem J.* **340**, 837-843.
- Johnston, P.; 3rd Benson, A.; Catalano, P.; Rao, M.; O'Dwyer, P. & Allegra, C. (2003), 'Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites.', *J Clin Oncol.* **21**(5), 815-9..
- Johnston, P.; Drake, J.; Trepel, J. & Allegra, C. (1992), 'Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines.', *Cancer Res.* **52**(16), 4306-12.
- Jonker, D.; O'Callaghan, C.; Karapetis, C.; Zalcberg, J.; Tu, D.; Au, H.; Berry, S.; Krahn, M.; Price, T.; Simes, R.; Tebbutt, .C.; van Hazel, G.; Wierzbicki, R.; Langer, C. & Moore, M. (2007), 'Cetuximab for the treatment of

## Bibliographie

colorectal cancer.', *N Engl J Med.* **357**(20), 2040-8.

Kahn, S.; Jiang, W.; Culbertson, T.; Weinstein, I.; Williams, G.; Tomita, N. & Ronai, Z. (1991), 'Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification', *Oncogene* **6**(6), 1079-83.

Kane, M.; Loda, M.; Gaida, G.; Lipman, J.; Mishra, R.; Goldman, H.; Jessup, J. & Kolodner, R. (1997), 'Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.', *Cancer Res.* **57**(5), 808-11.

Kaneda, S.; Nalbantoglu, J.; Takeishi, K.; Shimizu, K.; Gotoh, O.; Seno, T. & Ayusawa, D. (1990), 'Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene', *J Biol Chem* **265**(33), 20277-84.

Kaneda, S.; Takeishi, K.; Ayusawa, D.; Shimizu, K.; Seno, T. & Altman, S. (1987), 'Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA.', *Nucleic Acids Res.* **15**(3), 1259-70..

Kast, H.; Goodwin, B.; Tarr, P.; Jones, S.; Anisfeld, A.; Stoltz, C.; Tontonoz, P.; Kliewer, S.; Willson, T. & Edwards, P. (2002), 'Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor.', *J Biol Chem.* **277**(4), 2908-15.

Katoh, T.; Nagata, N.; Kuroda, Y.; Itoh, H.; Kawahara, A.; Kuroki, N.; Ookuma, R. & Bell, D. (1996), 'Glutathion S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma', *Carcinogenesis* **17**, 1855-1859.

Kawakami, K.; Ishida, Y.; Danenberg, K.; Omura, K.; Watanabe, G. & Danenberg, P. (2002), 'Functional polymorphism of the thymidylate synthase gene in colorectal cancer accompanied by frequent loss of heterozygosity.', *Jpn J Cancer Res.* **93**(11), 1221-9..

Kawakami, K.; Salonga, D.; Park, J.; Danenberg, K.; Uetake, H.; Brabender, J.; Omura, K.; Watanabe, G. & Danenberg, P. (2001), 'Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression.', *Clin Cancer Res.* **7**(12), 4096-101.

Kawakami, K. & Watanabe, G. (2003), 'Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene', *Cancer Res.* **63**(18), 6004-7.

Kawato, Y.; Aonuma, M.; Hirota, Y.; Kuga, H. & Sato, K. (1991), 'Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11.', *Cancer Res.* **51**(16), 4187-91.

Keeney, S.; Chang, G. & Linn, S. (1993), 'Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E', *J. Biol. Chem* **268**, 21293-21300.

Keku, T.; Millikan, R.; Worley, K.; Winkel, S.; Eaton, A.; Biscocho, L.; Martin, C. & Sandler, R. (2002), '5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and Whites.', *Cancer Epidemiology* **11**, 1611-1621.

Kelland, L. & McKeage, M. (1994), 'New platinum agents: A comparison in ovarian cancer.', *Drugs Aging* **5**, 85-95.

Kern, S.; Fearon, E. & Tersmette, K. (1989), 'Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma', *JAMA* **261**, 3099-3103.

Kikuchi-Yanoshita, R.; Konishi, M.; Ito, S.; Seki, M.; Tanaka, K.; Maeda, Y.; Iino, H.; Fukayama, M.; Koike, M. & Mori, T. (1992), 'Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients', *Cancer Res.* **52**(14), 3965-71.

Kimura, Y.; Selmi, C.; Leung, P.; Mao, T.; Schauer, J.; Watnik, M.; Kuriyama, S.; Nishioka, M.; Ansari, A.; Coppel, R.; Invernizzi, P.; Podda, M. & Gershwin, M. (2005), 'Genetic polymorphisms influencing xenobiotic

## Bibliographie

- metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis.', *Hepatology* **41**(1), 55-63.
- Kinosaki, M.; Masuko, T. & Sogawa, K. (1993), 'Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells', *Cell Struct Funct* **18**, 41-51.
- Kliwer, S. (2003), 'The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification.', *J. Nutr.* **133** (7 Suppl), 2444S-2447S.
- Kliwer, S.; Goodwin, B. & Willson, T. (2002), 'The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism.', *Endocr Rev* **23**(5), 687-702..
- Kliwer, S.; Moore, J.; Wade, L.; Staudinger, J.; Watson, M.; Jones, S.; McKee, D.; Oliver, B.; Willson, T.; Zetterström, R.; Perlmann, T. & Lehmann, J. (1998), 'An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway.', *Cell*. **92**(1), 73-82.
- Knab, A.; Fertala, J. & Bjornsti, M. (1993), 'Mechanisms of Camptothecin Resistance in Yeast DNA Topoisomerase I Mutants', *The Journal of Biological Chemistry* **268**(30), 22322-22330.
- Kobayashi, D.; Ieiri, I.; Hirota, T.; Takane, H.; Maegawa, S.; Kigawa, J.; Suzuki, H.; Nanba, E.; Oshimura, M.; Terakawa, N.; Otsubo, K.; Mine, K. & Sugiyama, Y. (2005), 'Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta', *Drug Metab Dispos.* **33**(1), 94-101.
- Koberle, B.; Masters, J.; Hartley, J. & Wood, R. (1999), 'Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumors', *Curr Biol* **9**, 273-6.
- Konishi, M.; Kikuchi-Yanoshita, R.; Tanaka, K.; Sato, C.; Tsuruta, K.; Maeda, Y.; Koike, M.; Tanaka, S.; Nakamura, Y. & Hattori, N. (1993), 'Genetic changes and histopathological grades in human hepatocellular carcinomas.', *Jpn J Cancer Res.* **84**(8), 893-9.
- Kornmann, M.; Link, K.; Lenz, H.; Pillasch, J.; Metzger, R.; Butzer, U.; Leder, G.; Weindel, M.; Safi, F.; Danenberg, K.; Beger, H. & Danenberg, P. (1997), 'Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy.', *Cancer Lett.* **118**(1), 29-35..
- Koyano, S.; Kurose, K.; Ozawa, S.; Saeki, M.; Nakajima, Y. & Sasegawa, R. (2002), 'Eleven novel single nucleotide polymorphisms in the NR1I2 (SXR) gene, four of which induce non-synonymous amino acid alterations', *Drug Metab. Pharmacokin.* **17**(6)(17), 561-565.
- Kraker, A. & Moore, C. (1988), 'Accumulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) and platinum analogues by platinum-resistant murine leukemia cells in vitro', *Cancer Res* **48**, 9-13.
- van Kuilenburg, A. (2004), 'Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil', *Eur J Cancer* **40**(7), 939-50.
- van Kuilenburg, A.; Muller, E.; Haasjes, J.; Meinsma, R.; Zoetekouw, L.; Waterham, H.; Baas, F.; Richel, D. & van Gennip, A. (2001), 'Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency', *Clin Cancer Res.* **7**(5), 1149-53.
- Kundu, N. & Heidelberger, C. (1974), 'Cyclopenta(f)isoquinoline derivatives designed to bind specifically to native deoxyribonucleic acid. 3. Interaction of 6-carbamylmethyl-8-methyl-7H-cyclopenta(f)isoquinolin-3(2H)-one with deoxyribonucleic acids and polydeoxyribonucleotides.', *Biochem Biophys Res Commun.* **60**(2), 561-8..
- Kweekel, D.; Gelderblom, H. & Guchelaar, H. (2005), 'Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy.', *Cancer Treat Rev.* **31**(2), 90-105.
- Kwon, H.; an S. Oh, M.; Kim, S.; Kim, M.; Kim, J. & et. al. (2007), 'Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer', *Oncol* **18**, 504-9.
- de Laat, W.; Jaspers, N. & Hoeijmakers, J. (1999), 'Molecular mechanisms of nucleotide excision repair', *Genes*

## Bibliographie

*Dev.* **13**, 768-785.

de Laat, W.; Sijbers, A.; Odijk, H.; Jaspers, N. & Hoeijmakers, J. (1998), 'Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF', *Nucleic Acids Res.* **26**, 4146-52.

Lamba, V.; Yasuda, K.; Lamba, J.; Assem, M.; Davila, J.; Strom, S. & Schuetz, E. (2004), 'PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators.', *Toxicol Appl Pharmacol.* **199**(3), 251-65.

Lampe, J. W.; Bigler, J.; Horner, N. K. & Potter, J. D. (1999), 'UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1\*28 and UGT1A6\*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations', *Pharmacogenetics.* **9**(3), 341-349.

Lankisch, T.; Vogel, A.; Eilermann, S.; Fiebeler, A.; Krone, B.; Barut, A.; Manns, M. & Strassburg, C. (2005), 'Identification and Characterization of a Functional TATA Box Polymorphism of the UDP Glucuronosyltransferase 1A7 Gene', *Mol Pharmacol* **67**, 1732–1739.

Lebwohl, D. & Canetta, R. (1998), 'Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update', *Eur J Cancer* **34**, 1522-34.

Lecomte, T.; Ferraz, J.; Zinzindohoué, F.; Lorient, M.; Tregouet, D.; Landi, B.; Berger, A.; Cugnenc, P.; Jian, R.; Beaune, P. & Laurent-Puig, P. (2004), 'Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy.', *Clin Cancer Res.* **10**(17), 5880-8.

Lecomte, T.; Landi, B.; Beaune, P.; Laurent-Puig, P. & Lorient, M. (2006), 'Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy', *Clin Cancer Res.* **12**(10), 3050-6.

Lee, K.; Parker, R.; Bohr, V.; Cornelison, T. & Reed, E. (1993), 'Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3', *Carcinogenesis* **14**, 2177-2180.

Lee, W.; Lockhart, A.; Kim, R. & Rothenberg, M. (2005), 'Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development', *Oncologist.* **10**(2), 104-11.

Lehmann, A. (2003), 'DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy', *Biochimie* **83**, 1101-11.

Lehmann, J. M.; McKee, D. D.; Watson, M. A.; Willson, T. M.; Moore, J. T. & Kliewer, S. A. (1998), 'The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions.', *J. Clin. Invest.* **102**, 1016–1023.

Leichman, C. (2001), 'Predictive and prognostic markers in gastrointestinal cancers.', *Curr Opin Oncol.* **13**(4), 291-9.

Leichman, C.; Lenz, H.; Leichman, L.; Danenberg, K.; Baranda, J.; Groshen, S.; Boswell, W.; Metzger, R.; Tan, M. & Danenberg, P. (1997), 'Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin.', *J Clin Oncol.* **15**(10), 3223-9.

Lelong, B.; Moutardier, V. & Delperro, J. (2004), 'Colorectal cancer: what should be the management of primary tumour?', *Rev Prat.* **54**(2), 155-66.

Lentz, F.; Tran, A.; Rey, E.; Pons, G. & Tréluyer, J. (2005), 'Pharmacogenomics of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin in hepatic metastases of colorectal cancer: clinical implications', *Am J Pharmacogenomics.* **5**(1), 21-33.

Li, D.; Firozi, P.; Wang, L.; Bosken, C.; Spitz, M.; Kong, W. & Wei, Q. (2001), 'Sensitivity to DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of lung cancer: a case-control analysis', *Cancer Res* **61**, 1445-1450.

## Bibliographie

- Li, L.; Elledge, S.; Peterson, C.; Bales, E. & Legerski, R. (1994), 'Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1', *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5012-6.
- Li, L.; Peterson, C.; Lu, X. & Legerski, R. (1995), 'Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair.', *Mol Cell Biol* **15**, 1993-1998.
- Li, X.; Haluska, P.; Hsiang, Y.; Bharti, A.; Kufe, D. & Rubin, E. (1996), 'Identification of topoisomerase I mutations affecting both DNA cleavage and interaction with camptothecin', *Ann N Y Acad Sci* **803**, 111-27.
- Lièvre, A.; Bachet, J.; Boige, V.; Cayre, A.; Corre, D. L.; Buc, E.; Ychou, M.; Bouché, O.; Landi, B.; Louvet, C.; André, T.; Bibeau, F.; Diebold, M.; Rougier, P.; Ducreux, M.; Tomasic, G.; Emile, J.; Penault-Llorca, F. & Laurent-Puig, P. (2008), 'KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab.', *J Clin Oncol* **26**(3), 374-9.
- Longley, D. B.; Harkin, D. P. & Johnston, P. (2003), '5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.', *Nat Rev Cancer* **3**(5), 330-8.
- Lu, Z.; Zhang, R.; Carpenter, J. & Diasio, R. (1998), 'Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy', *Clin Cancer Res* **4**(2), 325-9.
- Lu, Z.; Zhang, R. & Diasio, R. B. (1993), '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* **53**, 5433-5438.
- Lunn, R.; Langlois, R.; Hsieh, L.; Thompson, C. & Bell, D. (1999), 'XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency', *Cancer Res* **59**(11), 2557-61.
- Luo, F.; Wyrick, S. & Chaney, S. (1999), 'Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model.', *Cancer Chemother Pharmacol* **44**(1), 29-38.
- Luo, H.; Lü, X.; Yao, Y.; Horie, N.; Takeishi, K.; Jorde, L. & Zhang, Y. (2002), 'Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles.', *Biochem Genet* **40**(1-2), 41-51.
- Mackenzie, P.; Gregory, P.; Gardner-Stephen, D.; Lewinsky, R.; Jorgensen, B. & Nishiyama, T. (2003), 'Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase genes', *Curr Drug Metab* **4**, 249-257.
- Mackenzie, P. I.; Owens, I. S. & Burchell, B. (1997), 'The UDP glycosyltransferase gene superfamily recommended nomenclature update based on evolutionary divergence.', *Pharmacogenetics* **7**, 255-269.
- Maglich, J.; Stoltz, C. & Goodwin, B. (2002), 'Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification.', *Mol Pharmacol* **62**(3), 638-646.
- Mandola, M.; Stoehlmacher, J.; Muller-Weeks, S.; Cesarone, G.; Yu, M.; Lenz, H. & Ladner, R. (2003), '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* **63**(11), 2898-904.
- Mandola, M.; Stoehlmacher, J.; Zhang, W.; Groshen, S.; Yu, M.; Iqbal, S.; Lenz, H. & Ladner, R. (2004), 'A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels.', *Pharmacogenetics* **14**(5), 319-27.
- Mao, L.; Hruban, R.; Boyle, J.; Tockman, M. & Sidransky, D. (1994), 'Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancers.', *Cancer Res* **54**.
- Marcuello, E.; Altes, A.; Menoyo, A. & et al (2005), 'Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: Genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy?', *Cancer Chemother Pharmacol* **5**, 1-6.



## Bibliographie

- Marcuello, E.; Altes, A.; Menoyo, A.; Rio, E. & Baiget, M. (2006), 'Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy?', *Cancer Chemother Pharmacol* **57**, 835–840.
- Marcuello, E.; Altés, A.; Menoyo, A.; Del Rio, E.; Gómez-Pardo, M. & Baiget, M. (2004), 'UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer.', *Br J Cancer*. **91**(4), 678-82.
- Markowitz, S.; Wang, J.; Myeroff, L.; Parsons, R.; Sun, L.; Lutterbaugh, J.; Fan, R.; Zborowska, E.; Kinzler, K. & B. Vogelstein B, e. a. (1995), 'Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability', *Science* **268**(5215), 1336-8.
- Marsh, S.; Ameyaw, M. M.; Githang'a, J.; Indalo, A.; Ofori-Adjei, D. & McLeod, H. L. (2000), 'Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African population.', *Hum Mutat*. **16**, 528-533.
- Marsh, S.; Collie-Duguid, E. S.; Li, T.; Liu, X. & McLeod, H. L. (1999), 'Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations', *Genomics* **58**(3), 310-2.
- Marsin, S.; Vidal, A.; Sossou, M.; de Murcia, J. M.; Page, F. L.; Boiteux, S.; de Murcia, G. & Radicella, J. (2003), 'Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1.', *J Biol Chem*. **278**(45), 44068-74.
- Math, G.; Kidani, Y.; Segiguchi, M.; Eriguchi, M.; Fredj, G.; Peytavin, G.; Misset, J.; Brienza, S.; de Vassals, F.; Chenu, E. & Bourrut, C. (1991), 'Oxalato-platinum or oxaliplatin, a third generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum.', *Biomed. Pharmacother* **43**, 237-250.
- Mathijssen, H. J. R.; Marsh, S.; Karlsson, M. O.; Xie, R.; Baker, S. D.; Verweij, J.; Sparreboom, A. & McLeod, H. L. (2003), 'Irinotecan pathway Genotype Analysis to predict Pharmacokinetics.', *J. Cell Physiol*. **9**, 3246-3253.
- Matsumura, Y.; Nishigori, C.; Yagi, T.; Imamura, S. & Takebe, H. (1998), 'Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms', *Hum Mol Genet* **7**, 969-74.
- Mellon, I.; Spivak, G. & Hanawalt, P. (1987), 'Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene', *Cell* **51**, 241-249.
- Meyn, R.; Jenkins, S. & Thompson, L. (1982), 'Defective removal of DNA cross-links in a repair-deficient mutant of Chinese hamster cells', *Cancer Res* **42**, 3106-10.
- Mickley, L.; Jain, P.; Miyake, K.; Schriml, L. M.; Rao, K.; Fojo, T.; Bates, S. & Dean, M. (2001), 'An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain', *Mamm Genome* **12**, 86-88.
- Mishima, M.; Samimi, G.; et X. Lin, A. K.; Howell, S.; Hector, S. & et al. (2002), 'The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance', *Eur J Cancer* **1176**, 1405-1412.
- Misset, J.; Kidani, Y.; Gastiaburu, J.; Jasmin, C.; Levi, F.; Boughattas, N.; Lemaigre, G.; Caussanel, J.; Brienza, S.; Triana, B. K.; Goldschmidt, M.; Musset, M.; Mauvemay, R. & Math, G. (1991), 'Oxalatoplatinum (I-OHP): experimental and clinical studies. In: Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy', *Plenum Press*, 369-375.
- Mizuarai, S.; Aozasa, N. & Kotani, H. (2004), 'Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2', *Int J Cancer*. **109**(2), 238-46.
- Monaghan, G.; Ryan, M.; Seddon, R.; Hume, R. & Burchell, B. (1996), 'Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome', *Lancet* **347**, 578–581.
- Monzo, M.; Moreno, I.; Navarro, A.; Ibeas, R.; Artells, R.; Gel, B.; Martinez, F.; Moreno, J.; Hernandez, R. & Navarro-Vigo, M. (2007), 'Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD,

## Bibliographie

XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine', *Oncology* **72** (5-6), 364-70.

Moreno, V.; Gemignani, F.; Landi, S.; Gioia-Patricola, L.; Chabrier, A.; Blanco, I. & et al. (2006), 'Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer', *Clin Cancer Res* **12**, 2101-8.

Morganti, M.; Ciantelli, M.; Giglioni, B.; Putignano, A.; Nobili, S.; Papi, L.; Landini, I.; Napoli, C.; Valanzano, R.; Cianchi, F.; Boddi, V.; Tonelli, F.; Cortesini, C.; Mazzei, T.; Genuardi, M. & Mini, E. (2005), 'Relationships between promoter polymorphisms in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancers.', *Eur J Cancer*. **41**(14), 2176-83.

Moscow, J.; Fairchild, C.; Madden, M.; Ransom, D.; Wieand, H. & O'Brien, E. (1989), 'Expression of anionic glutathione S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors', *Cancer Res* **49**, 1422-8.

Motulsky, A. (2002), 'From pharmacogenetics and ecogenetics to pharmacogenomics', *Med Secoli*. **14**(3), 683-705.

Moussard, C. & Mougou, C. (2005), *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires*, De Boeck Université.

Mu, D. & Sancar, A. (1997), 'Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in human', *J. Biol. Chem* **272**, 7570-7573.

Mukai, M.; Kanzaki, A.; Chen, Z.; Miyashita, H.; Furukawa, T.; Sumizawa, T. & et al. (2002), 'Enhanced nucleotide excision repair in cisplatin resistant human KB carcinoma cells', *Oncol Rep* **9**, 839-44.

Munro, A.; Lain, S. & Lane, D. (2005), 'P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review.', *Br J Cancer*. **92**(3), 434-44.

Nabiev, I.; Fleury, F.; Kudelina, I.; Pommier, Y.; Charton, F.; Riou, J. F.; Alix, A. J. & Manfait, M. (1998), 'Spectroscopic and biochemical characterisation of self-aggregates formed by antitumor drugs of the camptothecin family: their possible role in the unique mode of drug action', *Biochem Pharmacol*. **55**(8), 1163-1174.

Nakamori, S.; Kameyama, M.; Furukawa, H.; Takeda, O.; Sugai, S.; Imaoka, S. & Nakamura, Y. (1997), 'Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes', *Dis Colon Rectum*(40), 29-36.

Nicolaidis, N.; Papadopoulos, N.; Liu, B.; Wei, Y.; Carter, K.; Ruben, S.; Rosen, C.; Haseltine, W.; Fleischmann, R. & Fraser, C. (1994), 'Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer', *Nature* **371**(6492), 75-80.

Paradiso, A.; Simone, G.; Petroni, S.; Leone, B.; Vallejo, C.; Lacava, J.; Romero, A.; Machiavelli, M.; Lena, M. D.; Allegra, C. & Johnston, P. (2000), 'Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients.', *Br J Cancer*. **82**(3), 560-7..

Park, C. & Sancar, A. (1994), 'Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1 and ERCC4 (XPF) excision repair proteins', *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5017-21.

Park, D.; Stoehlmacher, J.; Zhang, W.; Tsao-Wei, D.; Groshen, S. & Lenz, H. (2001), 'A xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer', *Cancer Res* **61**, 8654-8658.

Park, D.; Zhang, W.; Stoehlmacher, J.; Tsao-Wei, D.; Groshen, S.; Gil, J.; Yun, J.; Sones, E.; Mallik, N. & Lenz, H. (2003), 'ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy', *Clin Adv Hematol Oncol*. **1**(3), 162-6.

Parker, W. B. & Cheng, Y. C. (1990), 'Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil', *Pharmacol Ther* **48**, 430-437.

## Bibliographie

- Pascussi, J.; Drocourt, L.; Gerbal-Chaloin, S.; Fabre, J.; Maurel, P. & Vilarem, M. (2001), 'Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor.', *Eur J Biochem.* **268**(24), 6346-58.
- Pendyala, L. & Creaven, P. (1993), 'In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin', *Cancer Res* **53**, 5970-5976.
- Pendyala, L.; Kidani, Y.; Perez, R.; Wilkes, J.; Bernacki, R. & Creaven, P. (1995), 'Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers', *Cancer Lett* **97**, 177-184.
- Perez, R. (1998), 'Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance', *Eur J Cancer* **34**, 1535-42.
- Pommier, Y. (2006), 'Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond.', *Nat Rev Cancer.* **6**(10), 789-802.
- Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Kohn, K.; Leteurtre, F.; Wani, M. & Wall, M. (1995), 'Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites.', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(19), 8861-8865.
- Popat, S.; Matakidou, A. & Houlston, R. (2004), 'Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.', *J Clin Oncol.* **22**(3), 529-36.
- Pullarkat, S.; Stoehlmacher, J.; Ghaderi, V.; Xiong, Y.; Ingles, S.; Sherrod, A.; Warren, R.; Tsao-Wei, D.; Groshen, S. & Lenz, H. (2001), 'Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy.', *Pharmacogenomics J* **1**, 65-70..
- Pullmann, R.; Abdelmohsen, K.; Lal, A.; Martindale, J.; Ladner, R. & Gorospe, M. (2006), 'Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1.', *J Biol Chem.* **28**(33), 23456-63..
- Rampino, N.; Yamamoto, H.; Ionov, Y.; Li, Y.; Sawai, H.; Reed, J. & Perucho, M. (1997), 'Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype.', *Science* **275**(5302), 967-9.
- Rasheed, Z. A. & Rubin, E. H. (2003), 'Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs.', *Oncogene* **22**, 7296-7304.
- Raymond, E.; Chaney, S.; Taamma, A. & Cvitkovic, E. (1998), 'Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies', *Ann Oncol* **9**(10), 1053-71.
- Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J. & Cvitkovic, E. (2002), 'Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin', *Mol Cancer Therap* **1**, 227-35.
- Raymond, E.; Faivre, S.; Woynarowski, J. & Chaney, S. (1998), 'Oxaliplatin: Mechanism of action and antineoplastic activity', *Semin Oncol* **25**, 4-12.
- Raymond, E.; Faivre, S.; Woynarowski, J. & Chaney, S. (1998), 'Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity', *Semin Oncol* **25**, 4-12.
- Reardon, J.; Vaisman, A.; Chaney, S. & Sancar, A. (1999), 'Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-ammine-dichlorocyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts', *Cancer Res* **59**, 3968-3971.
- Reed, E. (1998), 'Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anticancer chemotherapy', *Cancer Treat Rev* **24**, 331-344.
- Reed, E.; Dabholkar, M.; Thornton, K.; Thompson, C.; Yu, J. & Bostick-Bruton, F. (2000), 'Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues', *Oncol Rep.* **7**(5), 1123-8.
- Remontet, L.; Estève, J.; Bouvier, A.; Grosclaude, P.; Launoy, G.; Menegoz, F.; Exbrayat, C.; Tretare, B.; Carli, P.; Guizard, A.; Troussard, X.; Berceili, P.; Colonna, M.; Halna, J.; Hedelin, G.; Macé-Lesec'h, J.; Peng, J.;

## Bibliographie

- Buemi, A.; Velten, M.; Jouglu, E.; Arveux, P.; Bodic, L. L.; Michel, E.; Sauvage, M.; Schwartz, C. & Faivre, J. (2003), 'Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000.', *Rev Epidemiol Sante Publique*. **51**(1 Pt 1), 3-30.
- Rivory, L. & Robert, J. (1995), 'Pharmacology of camptothecin and its derivatives', *Bull Cancer*. **82**(4), 265-85.
- Rixe, O.; Ortuzar, W.; Alvarez, M.; Parker, R.; Reed, E.; Paull, K. & Fojo, T. (1996), 'Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel.', *Biochem Pharmacol* **52**, 1855-1865.
- Rocchi, E.; Khodjakov, A.; Volk, E. L.; Yang, C. H.; Litman, T.; Bates, S. E. & Schneider, E. (2000), 'The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane', *Biochem Biophys Res Commun*. **271**, 42-46.
- Ronaghi, M. (2001), 'Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing', *Genome Res*. **11**(1), 3-11.
- Ronaghi, M.; Karamohamed, S.; Pettersson, B.; Uhl m, M. & Nyr n, P. (1996), 'Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release', *Anal Biochem*. **242**, 84-89.
- Ross, D.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Dalton, W. S.; Schneider, E.; Lage, H.; Dietel, M.; Greenberger, L.; Cole, S. P. & Doyle, L. A. (1999), 'Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines', *J Natl Cancer Inst*. **91**, 429-33.
- Rouits, E.; Boisdron-Celle, M.; Dumont, A.; Gu rin, O.; Morel, A. & Gamelin, E. (2004), 'Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients.', *Clin Cancer Res*. **10**(15), 5151-9.
- Roy, R.; Adamczewski, J.; Seroz, T. & et al. (1994), 'The MO15 cell-cycle kinase is associated with the TFIID transcription-DNA repair factor', *Cell* **79**, 1093-101.
- Russo, A.; Bazan, V.; Iacopetta, B.; Kerr, D.; Soussi, T. & Gebbia, N. (2005), 'TP53-CRC Collaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment.', *J Clin Oncol*. **23**(30), 7518-28.
- Ruzzo, A.; Graziano, F.; Loupakis, F. & et al (2007), 'Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy.', *J Clin Oncol* **25**, 1247-1254.
- Saltz, L. (2000), 'Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer', *Oncology (Williston Park)* **14**(12), 47-50.
- Sanderson, B.; Ferguson, L. & Denny, W. (1996), 'Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs', *Mutat Res* **355**, 59-70.
- Santi, D. V.; McHenry, C. & Sommer, H. (1974), 'Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate.', *Biochemistry* **13**(3), 471-81.
- Santos, A.; Zanetta, S.; Cresteil, T.; Deroussent, A.; Pein, F.; Raymond, E.; Vernillet, L.; Risse, M.; Boige, V.; Gouyette, A. & Vassal, G. (2000), 'Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans.', *Clin Cancer Res*. **6**(5), 2012-20.
- Schaaf, M. & Cidlowski, J. (2002), 'AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression.', *Steroids*. **67**(7), 627-36.
- Scheeff, E.; Briggs, J. & Howell, S. (1999), 'Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin', *Mol Pharmacol* **56**, 633-643.
- Shah, M. & Schwartz, G. (2001), 'Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy', *Clin Cancer Res*. **7**(8), 2168-81.

## Bibliographie

- Shen, M.; Jones, I. & Mohrenweiser, H. (1998), 'Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans', *Cancer Res* **58**(4), 604-608..
- Shirota, Y.; Stoehlmacher, J.; Brabender, J.; Xiong, Y.; Uetake, H.; Danenberg, K.; Groshen, S.; Tsao-Wei, D.; Danenberg, P. & Lenz, H. (2001), 'ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy', *J Clin Oncol* **19**(23), 4298-304..
- Simpson, D.; Dunn, C.; Curran, M. & Goa, K. (2003), 'Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer', *Drugs* **63**(19), 2127-2156.
- Smith, J. & Pereira-Smith, O. (1996), 'Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression', *Science* **273**, 63-67.
- Sorenson, G.; Pribish, D.; Valone, F.; Memoli, V.; Bzik, D. & Yao, S. (1994), 'Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood', *Cancer Epidemiol, Biomarkers* **3**, 67-71.
- Souza, R.; Appel, R.; Yin, J.; Wang, S.; Smolinski, K.; Abraham, J.; Zou, T.; Shi, Y.; Lei, J.; Cottrell, J.; Cymes, K.; Biden, K.; Simms, L.; Leggett, B.; Lynch, P.; Frazier, M.; Powell, S.; Harpaz, N.; Sugimura, H.; Young, J. & Meltzer, S. (1996), 'Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours', *Nat Genet* **14**(4), 488.
- Souza, R.; Yin, J.; Smolinski, K.; Zou, T.; Wang, S.; Shi, Y.; Rhyu, M.; Cottrell, J.; Abraham, J.; Biden, K.; Simms, L.; Leggett, B.; Bova, G.; Frank, T.; Powell, S.; Sugimura, H.; Young, J.; Harpaz, N.; Shimizu, K.; Matsubara, N. & Meltzer, S. (1997), 'Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors', *Cancer Res.* **57**(12), 2350-3.
- Spears, C.; Gustavsson, B.; Berne, M.; Frosing, R.; Bernstein, L. & Hayes, A. (1988), 'Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil', *Cancer Res.* **48**(20), 5894-5900.
- Spitz, M.; Wu, X.; Wang, Y.; Wang, L.; Shete, S.; Amos, C.; Guo, Z.; Lei, L. & et. al. (2001), 'Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients', *Cancer Res* **61**, 1354-1357.
- States, J. & Reed, E. (1996), 'Enhanced XPA mRNA levels in cisplatin-resistant human ovarian cancer are not associated with XPA mutations or gene amplification', *Cancer Lett* **108**, 233-7.
- Stewart, D. (2007), 'Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin', *Crit Rev Oncol Hematol* **63**, 12-31.
- Stoehlmacher, J.; Ghaderi, V.; Iobal, S. & et al (2001), 'A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer.', *Anticancer Res* **21**, 3075-3079.
- Stoehlmacher, J.; Goekkurt, E. & Lenz, H. (2003), 'Pharmacogenetic aspects in treatment of colorectal cancer--an update', *Pharmacogenomics.* **4**(6), 767-77.
- Stoehlmacher, J.; Park, D.; Zhang, W.; Groshen, S.; Tsao-Wei, T. & Yu, M. (2002), 'Association between glutathione S-transferase P1, T1 and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer', *J. Natl Cancer Inst* **94**, 936-42.
- Stoehlmacher, J.; Park, D.; Zhang, W.; Yang, D.; Groshen, S.; Zahedy, S. & Lenz, H. (2004), 'A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer', *Br J Cancer.* **91**(2), 344-54..
- Strange, R. & Fryer, A. (1999), 'The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility', *IARC Sci Publ* **148**, 231-49.
- Strange, R.; Matharoo, B.; Faulder, G.; Jones, P.; Cotton, W.; Elder, J. & Deakin, M. (1991), 'The human glutathione S-transferase: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma', *Carcinogenesis* **12**, 25-28.
- Strassburg, C.; Oldhafer, K.; Manns, M. & RH., R. T. (1997), 'Differential expression of the UGT1A locus in

## Bibliographie

human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue', *Mol Pharmacol.* **2**(2), 212-20.

Strassburg, C.; Vogel, A.; Kneip, S.; Tukey, R. & Manns, M. (2002), 'Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer', *Gut* **50**, 851–856.

Sugasawa, K.; Ng, J.; Masutani, C.; Iwai, S.; van der Spek, P.; Eker, A.; Hanaoka, F.; Bootsma, D. & Hoeijmakers, J. (1998), 'Xeroderma pigmentosum group C protein complex ins the initial of global genome nucleotide excision repair', *Mol. Cell* **2**, 223-232.

Sugio, K.; Uramoto, H.; Ono, K.; Oyama, T.; Hanagiri, T.; Sugaya, M.; Ichiki, Y.; So, T.; Nakata, S.; Morita, M. & Yasumoto, K. (2006), 'Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking', *Br J Cancer.* **94**(6), 896-903.

Suh, K.; Kim, J.; Kim, D.; Kim, B.; Lee, C. & Choi, S. (2006), 'Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy, the MTHFR or XRCC1 gene?', *Ann Surg Oncol* **13**, 1379–1385.

Suk, R.; Gurubhagavatula, S.; Park, S. & et al (2005), 'Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients.', *Clin Cancer Res* **11**, 1534-1538.

Sung, P.; Bailly, V.; Weber, C.; Thompson, L. H.; Parakash, L. & Parakash, S. (1993), 'Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase', *Nature* **365**, 852-855.

Suzuki, H.; Itoh, F.; Toyota, M.; Kikuchi, T.; Kakiuchi, H.; Hinoda, Y. & Imai, K. (1999), 'Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer', *Int J Cancer.* **83**(3), 309-13.

Tada, M.; Omata, M.; Kawai, S.; Saisho, H.; Ohto, M.; Saiki, R. & Sninsky, J. (1993), 'Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheralblood of patients with pancreatic adenocarcinoma', *Cancer Res* **53**, 2472–4.

Takatani, H.; Oka, M.; Fukuda, M. & et al. (1997), 'Gene mutation analysis and quantification of DNA topoisomerase I in previously untreated non-small cell lung carcinomas.', *Jpn J Cancer Res* **88**, 160-5.

Takeda, S.; Ichii, S.; Nakamura, Y. & Satomura, Y. (1993), 'Detection of K-ras mutations in sputum by mutant allele specific amplification (MASA)', *Hum. Mutat* **2**, 112-117.

Takeishi, K.; Kaneda, S.; Ayusawa, D.; Shimizu, K.; Gotoh, O. & Seno, T. (1985 ), 'Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase', *Nucleic Acids Res.* **13**(6), 2035-43.

Teniere, P.; Songne, K.; Frebourg, T.; Moguelet, P.; Foulatier, O.; Michot, F. & et al. (2002), 'Polypose juvénile familiale. Intérêt de l'étude génétique et place du traitement chirurgical.', *Gastroenterol Clin Biol* **26**, 1047–50.

Thijssen, M.; Swinkels, D.; Ruers, T. & et al. (2002), 'Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients withcolorectal liver metastasis', *Anticancer Res* **22**, 421–425.

Thomas, D. & Zalberg, J. (1998), '5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics.', *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**(11), 887-95.

Tibaldi, C.; Giovannetti, E.; Vasile, E.; Mey, V.; Laan, A.; Nannizzi, S.; Marsico, R. D.; Antonuzzo, A.; Orlandini, C.; Ricciardi, S.; DelTacca, M.; Peters, G.; Falcone, A. & Danesi, R. (2008), '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* **14**(6), 1797-1803.

Tobi, M.; Luo, F. & Ronai, Z. (1994), 'Detection of K-ras mutation in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma', *J Natl Cancer Inst* **86**, 1007–10.

Tournigand, C.; Andre, T.; Achille, E. & et al. (2004), 'FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer : A randomized GERCOR study.', *J Clin Oncol* **22**, 229-37.

Toyota, M.; Ahuja, N.; Suzuki, H.; Itoh, F.; Ohe-Toyota, M.; Imai, K.; Baylin, S. & Issa, J. (1999), 'Aberrant

## Bibliographie

- methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype', *Cancer Res.* **59**(21), 5438-42.
- Triest, B. V.; Pinedo, H.; Giaccone, G. & Peters, G. (2000), 'Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors.', *Ann Oncol* **11**(4), 385–391..
- Triest, B. V.; Pinedo, H.; van Hensbergen, Y.; Smid, K.; Telleman, F.; Schoenmakers, P. & et al. (1999), 'Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 non-selected colon cancer cell lines.', *Clin Cancer Res* **5**, 643-54.
- Tsurutani, J.; Nitta, T.; Hirashima, T.; Komiya, T.; Uejima, H.; Tada, H.; Syunichi, N.; Tohda, A.; Fukuoka, M. & Nakagawa, K. (2002), 'Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan.', *Lung Cancer* **35**, 299-304.
- Tuchman, M.; Stoeckeler, J. S.; Kiang, D. T.; O'Bea, R. F.; Ramnaine, M. L. & Mirkin, B. L. (1985), 'Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with sever fluorouracile toxicity', *N Eng J Med.* **313**, 245-249.
- Ulrich, C.; Bigler, J.; Velicer, C.; Greene, E.; Farin, F. & Potter, J. (2000), 'Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene.', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**(12), 1381-5.
- Urasaki, Y.; Laco, G.; Takebayashi, Y.; Bailly, C.; Kohlhagen, G. & Pommier, Y. (2001), 'Use of camptothecin-resistant mammalian cell lines to evaluate the role of topoisomerase I in the antiproliferative activity of the indolocarbazole, NB-506, and its topoisomerase I binding site', *Cancer Res.* **61**(2), 504-8.
- Vallbohmer, D.; Iqbal, S.; Yang, D.; Rhodes, K.; Zhang, W.; Gordon, M. & et. al. (2006), 'Molecular determinants of irinotecan efficacy', *Int J Cancer* **119**, 2435-42.
- Vanhoefer, U.; Harstrick, A.; Achterrath, W.; Cao, S.; Seeber, S. & Rustum, Y. M. (2001), 'Irinotecan in the treatment of colorectal cancer', *J Clin Oncol.* **19**(5), 1501-18.
- Vasioukhin, V.; Anker, P.; Maurice, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C. & Stroun, M. (1994), 'Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia', *Br. J. Haematol* **86**, 774-779.
- Veigl, M.; Kasturi, L.; Olechnowicz, J.; Ma, A.; Lutterbaugh, J.; Periyasamy, S.; Li, G.; Drummond, J.; Modrich, P.; Sedwick, W. & Markowitz, S. (1998), 'Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers', *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(15), 8698-702.
- Venema, J.; van Hoffen, A.; Karcagi, V.; Natarajan, A.; van Zeeland, A. & Mullenders, L. (1991), 'Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes', *Mol. Cell. Biol* **11**, 4128-4134.
- Vesell, E. (1986), 'Pharmacogenetic approaches to the prediction of drug response', *NIDA Res Monogr.* **66**, 25-40.
- Viguier, J.; Boige, V.; Miquel, C.; Pocard, M.; Giraudeau, B.; Sabourin, J.; Ducreux, M.; Sarasin, A. & Praz, F. (2005), '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.* **11**(17), 6212-7.
- Villeneuve, L.; Girard, H.; Fortier, L.; Gagne, J. & Guillemette, C. (2003), 'Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs', *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 117–128.
- Vogel, A.; Kneip, S.; Barut, S.; Ehmer, U.; Tukey, R.; Manns, M. & Strassburg, C. (2001), 'Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDPglucuronosyltransferase UGT1A7 gene.', *Gastroenterology* **121**, 1136–1144.

## Bibliographie

- Vogelstein, B.; Fearon, E.; Hamilton, S.; Kern, S.; Preisinger, A.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A. & Bos, J. (1988), 'Genetic alterations during colorectal-tumor development', *N Engl J Med.* **319**(9), 525-32.
- Vogelstein, B.; Fearon, E.; Kern, S.; Hamilton, S.; Preisinger, A.; Nakamura, Y. & White, R. (1989), 'Allelotype of colorectal carcinomas', *Science* **244**(4901), 207-11.
- Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T. & Sim, G. A. (1966), 'Plant anti-tumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*', *J. Amer. Chem* **88**, 3888-3890.
- Wang, J. (2002), 'Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective.', *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(6), 430-40.
- Wang, J. (1987), 'Recent studies of DNA topoisomerases.', *Biochim Biophys Acta.* **909**(1), 1-9.
- Wang, L.; Ting, C.; Lo, C.; Su, J.; Mickley, L.; Fojo, A.; Whang-Peng, J. & Hwang, J. (1997), 'Identification of mutations at DNA topoisomerase I responsible for camptothecin resistance.', *Cancer Res.* **57**(8), 1516-22.
- Watson, M.; Stewart, R.; Smith, G. & et al (1998), 'Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution.', *Carcinogenesis* **19**, 275-280.
- Webb, G.; Vaska, V.; Coggan, M. & Board, P. (1996), 'Chromosomal localisation of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1)', *Genomics* **33**, 121-123.
- Weiss, R. & Christian, M. (1993), 'New cisplatin analogues in development: A review.', *Drugs* **46**, 360-377.
- Westlind-Johnsson, A.; Malmebo, S. & Johansson, A. (2003), 'Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism.', *Drug Metab Dispos* **31**(6), 755-761..
- Wilson, M.; Ruttan, C.; Koop, B. & Glickman, B. (2001), 'ERCC1: a comparative genomic perspective.', *Environ Mol Mutagen* **38**, 209-215.
- Wood, R. (1996), 'DNA repair in eukaryotes.', *Annu Rev Biochem* **65**, 135-67.
- Wood, R.; Mitchell, M.; Sgouros, J. & Lindahl, T. (2001), 'Human DNA repair genes', *Science* **291**(5507), 1284-9.
- Woynarowski, J.; Chapman, W.; Napier, C.; Herzig, M. & Juniewicz, P. (1998), 'Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA', *Mol Pharmacol* **54**, 770-777.
- Woynarowski, M.; Herzig, S. F. M.; William, B. A.; Chapman, G.; Trevino, A.; Raymond, E.; Chaney, S.; Vaisman, A.; Varchenko, M. & Juniewicz, P. (2000), 'Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA', *Mol Pharmacol* **58**, 920-927.
- Wu, D.; Ugozzoli, L.; Pal, B. & Wallace, R. (1989), 'Allele-specific enzymatic amplification of b-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia', *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2757- 60.
- Wu, M.; Yan, B.; Humerickhouse, R. & Dolan, M. (2002), 'Irinotecan activation by human carboxylesterases in colorectal adenocarcinoma cells.', *Clin Cancer Res.* **8**(8), 2696-700.
- Xie, W.; Barwick, J. L.; Simon, C. M.; Pierce, A. M.; Safe, S.; Blumberg, B.; S., G. P. & M., E. R. (2000), 'Reciprocal activation of Xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR.', **14**, 3014-302.
- Xie, W.; Yeuh, M. F.; Pandya, A. R.; Saini, S. P. S.; Negishi, Y.; Bottroff, B. S.; Cabrera, G. Y.; Tukey, R. H. & Evans, R. M. (2003), 'Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor', *Medical Sciences* **100**(7), 4150-4155.
- Xu, G.; Zhang, W.; Ma, M. & McLeod, H. (2002), 'Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan.', *Clin Cancer Res.* **8**(8), 2605-11.



## Bibliographie

- Yamada, T.; Nakamori, S.; Ohzato, H. & et al. (1998), 'Detection of K-ras gene mutations in plasma patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features', *Clin Cancer Res* **4**, 1527-1532.
- Yamamoto, H.; Perez-Piteira, J.; Yoshida, T.; Terada, M.; Itoh, F.; Imai, K. & Perucho, M. (1999), 'Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features.', *Gastroenterology* **116**(6), 1348-57.
- Yamamoto, K.; Sato, H.; Fujiyama, Y.; Doida, Y. & Bamba, T. (1998), 'Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II', *Biochim Biophys Acta*. **1406**(3), 267-73.
- Youn, C.; Kim, M.; Cho, H.; Kim, H.; Chang, I.; Chung, M. & You, H. (2004), 'Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents.', *Cancer Res*. **64**(14), 4849-57.
- Yu, J.; Lee, K.; Mu, C.; Li, Q.; Abernathy, T.; Bostick-Bruton, F. & Reed, E. (2000), 'Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene', *Int J Oncol* **16**(3), 555-60..
- Yu, J.; Mu, C.; Lee, K.; Okamoto, A.; Reed, E.; Bostick-Bruton, F.; Mitchell, K. & Reed, E. (1997), 'A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues', *Mutat Res* **382**(1-2), 13-20..
- Zhang, J.; Kuehl, P.; Green, E.; Touchman, J.; Watkins, P.; Daly, A.; Hall, S.; Maurel, P.; Relling, M.; Brimer, C.; Yasuda, K.; Wrighton, S.; Hancock, M.; Kim, R.; Strom, S.; Thummel, K.; Russell, C.; Hudson, J. J.; Schuetz, E. & Boguski, M. (2001), 'The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants.', *Pharmacogenetics*. **11**(7), 555-72.
- Zheng, Z.; Park, J.; Guillemette, C.; Schantz, S. & Lazarus, P. (2001), 'Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk.', *J Natl Cancer Inst* **93**, 1411-1418.
- Zhu, J. & Schiestl, R. (1996), 'Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Mol Cell Biol*. **16**(4), 1805-12.

## Annexes

**Annexe I : Séquence des amorces utilisées pour les PCR**

Gène	SNP	Séquence des primers 5' → 3'	Temp. hybridation (°C)
MTHFR	C667T	(Sens) TATTGGCAGGTTACCCAAA (reverse)Biot CTCACCTGGATGGGAAAGAT (seq) AGAAGGTGTCTGCCG	57.0
MTHFR	A1298C	(sens) GCCAGGGGCAATTCCTCTT (reverse) CTTTGTGACCATTCCGGTTT (seq) GGAGCTGACCAGTGAAG	57.0
GSTP1	Ile105Val	(sens) GGACCTCCGCTGCAAATAC (reverse)Biot GGCACAAGAAGCCCTTT (seq) ACCTCCGCTGCAAAT	56.0
GSTP1	Ala114Val	(sens) GGATGATACATGGTGGTGTCTG (reverse) Biot GGACAGCAGGGTCTCAAAAG (seq) GTGTCTGGCAGGAGG	56.0
ABCG2	Q126stop	(sens) AGCTGCAAGGAAAGATCCAA (reverse) Biot ATCAGCCAAAGCACTTACCC (seq) AATGTAATTCAGGTTACGTG	56.0
ABCG2	Q141K	(sens) Biot ATGATGTTGTGATGGGCACTC (reverse) TTTTCCACATTACCTTGGAGTCTG (seq) GAAGAGCTGCTGAGAAC	56.0
SXR	C-25385T	(sens) AGTCCAAATGTTACACCTGAAGA (reverse)Biot ACAAGCCTCTGGCAACAGTAA (seq) GGTCATTTTTTGGCA	56.0
SXR	C8055T	(sens) TACGCCAGGATATGCAGGTT (reverse)Biot GCATGGGCTCCAGTAGAAGTT (seq) TGCTGAGAAGCTGCC	58.0
ERCC1	C118T	(sens) TGTGGTTATCAAGGGTCATCC (reverse)Biot CCAGCACATAGTCGGGAATTA (seq) ACTGAAGTTCGTGCG	58.0
ERCC1	3'UTR	(sens)Biot CCGGGGGCAGACTACACA (reverse) AGAGACAGTGCCCCAAGAGG (seq) GGACAAGAAGCGGAA	58.0
XRCC1	Arg399Gln	(sens)Biot CCCAAGTACAGCCAGGTCCTA (reverse) TGACTCCCCTCCAGATTCCT (seq) CGTGTGAGGCCTTACC	58.0
XPB	K117R	(sens) ATCTCTCAGGCTCCCGATGG (reverse)Biot TTGCAGCCCAACGCTGAC (seq) CCCATGTGCATGAGT	62.0
XPA	5'UTR	(sens) TGGAGCTGGGAGCTAGGTC (reverse)Biot CTCCGCGGGTTGCTCTAA (seq) AGTCTCTCGGAGTGG	56.0
XPD	Lys751Gln	(sens) CGCTCTGGATTATACGGACATCTC (reverse)Biot GGAGTCACCAGGAACCGTTTAT (seq) GCTAGAATCAGAGGAGACG	58.0
K-Ras	Codons 12 et 13	(sens) AACCTTATGTGTGACATGTTCT (reverse)Biot TCGTCCACAAAATGATTCTGA (seq) CTGTGGTAGTTGGAGC	54.0
TS	5'UTR (VNTR)	(sens) GTCCTGCCACCGCGCCACTT (reverse) GAGCCGGCCACAGGCATGG	55.0

**Annexe II : Séquence des amorces utilisées pour les qPCR**

<b>Gène</b>	<b>Séquence des primers qPCR</b>	<b>Tm (°C)</b>
G3	(sens) 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'	58.8
	(reverse) 5' - GAAGATGGTGATGGGATTTC -3'	55.3
ERCC1	(sens) 5' - TCCAGGTGGATGTGAAAGAT -3'	55.3
	(reverse) 5' - ACGGTGGTCAGACATTCAGT -3'	57.3
XPA	(sens) 5' - GCATGGCTAATGTAAAAGCA -3'	53.2
	(reverse) 5' - TCCTGTCCGACTTCCTTTGC -3'	59.4
XPF	(sens) 5' - GAGTAGGCCTGGGAAACCTC -3'	61.4
	(reverse) 5' - TCCGAGTGTTCAGTGGAAACA -3'	57.3

## **Résumé**

Le cancer colorectal, historiquement de mauvais pronostic, a fait au cours des années l'objet de nombreuses recherches qui ont changé sa prise en charge notamment par l'évaluation de nouvelles thérapies, la recherche de facteurs prédictifs de sensibilité à la chimiothérapie ou de nouveaux marqueurs de pronostic. L'association des plusieurs molécules dans un protocole chimiothérapeutique représente le pilier du traitement du cancer colorectal métastatique. Elle peut être responsable d'une augmentation du taux de réponse, ainsi que d'une augmentation de la survie des patients. Les protocoles qui utilisent l'association entre l'acide L-folinique, le 5-FU et l'Irinotécan (FOLFIRI) ou l'Oxaliplatine (FOLFOX) sont devenu les protocoles les plus souvent utilisés, en première ligne chimiothérapeutique, pour traiter les cancers colorectaux. En même temps, les polymorphismes génétiques au niveau des gènes cibles des médicaments ou encore au niveau des gènes impliqués dans les voies de détoxification, ainsi qu'au niveau des gènes intervenant dans les processus de réparation de l'ADN peuvent peser sur l'activité de ces molécules chimiothérapeutiques.

En conséquence nous sommes intéressés au cours de cette thèse à la recherche des facteurs prédictifs de l'efficacité et de la tolérance aux traitements utilisant principalement les trois molécules (5-FU, Irinotécan et Oxaliplatine). L'individualisation thérapeutique en fonction du profil pharmacogénétique du chaque patient, rendra possible, d'un côté, la diminution des toxicités et, d'un autre côté, l'augmentation de l'efficacité du traitement, accompagnée de l'amélioration de la qualité de vie des patients.

**Mots clé :** Irinotécan, 5-FU, Oxaliplatine, Pharmacogénétique, Polymorphismes

## **Abstract**

Historically with a poor prognosis, colorectal cancer has been over the years the subject of many researches that have changed its supported. We mention here the evaluation of new therapies, the search for molecular predictors factors for chemotherapy sensitivity or even the search for new prognostic markers. In patients with metastatic colorectal cancer, the association of several cytotoxic agents into the chemotherapy treatment represents an important step in fighting this disease. It can lead to an increase in response rate and also an increase in patient survival. The protocols that use the association between 5-FU with folinic acid modulation and Irinotecan (FOLFIRI) or Oxaliplatin (FOLFOX) have become the most commonly used protocols in first-line chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancers. Unfortunately, genetic polymorphisms in drug targets, or genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes as well as the genetic polymorphisms in genes involved in the process of DNA repair may influence the activity of the chemotherapeutic agents.

Therefore we are interested in this thesis to identify genetics factors associated with toxicity and response to Irinotecan and Oxaliplatin in metastatic colorectal cancer. Individualizing therapy based on pharmacogenetic profile of each patient will make possible to obtain a lower toxicity and a higher efficacy of treatment, accompanied by an improved patients' quality of life.

**Keywords:** Irinotecan, 5-FU, Oxaliplatin, Pharmacogenetics, Polymorphisms