

Etude de l'effet sur la P-glycoprotéine (ABCB1) de deux médicaments dirigés contre le récepteur de facteur de croissance épithélial (EGFR), le cétuximab et le lapatinib et conséquence sur la pharmacocinétique et l'efficacité anti-tumorale de médicaments substrats de ABCB1

Céline Chu

▶ **To cite this version:**

Céline Chu. Etude de l'effet sur la P-glycoprotéine (ABCB1) de deux médicaments dirigés contre le récepteur de facteur de croissance épithélial (EGFR), le cétuximab et le lapatinib et conséquence sur la pharmacocinétique et l'efficacité anti-tumorale de médicaments substrats de ABCB1. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114806 . tel-00868797

HAL Id: tel-00868797

https://theses.hal.science/tel-00868797

Submitted on 2 Oct 2013

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THERAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUE

POLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE :

Pharmacologie expérimentale et clinique

ANNEE 2012-2013 SERIE DOCTORAT N°1224

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 18/03/2013

par

Céline CHU

Etude de l'effet sur la P-glycoprotéine (ABCB1) de deux médicaments dirigés contre le récepteur de facteur de croissance épithélial (EGFR), le cétuximab et le lapatinib et conséquence sur la pharmacocinétique et l'efficacité anti-tumorale de médicaments substrats de ABCB1

Directeur de thèse : Laurence Bonhomme-Faivre MCU-PH (Université Paris-Sud XI)

Composition du jury :

Rapporteurs :	Jean-François Morère	PU-PH (Université Paris XIII)
	Michel Vidal	PU-PH (Université Paris V)
Examinateurs :	Jean Bénard	PH (Institut Gustave Roussy Villejuif)
	Bertrand Diquet	PU-PH (CHU Angers)

Remerciements

Ce projet scientifique a fait l'objet d'une attention et d'un soin particulier de la part de tous ceux qui ont participé à sa réalisation.

Je tiens particulièrement à remercier :

Messieurs les Professeurs Jean-François Morère et Michel Vidal,
Pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire et me faire l'honneur d'évaluer ce travail.
Monsieur le Professeur Bertrand Diquet et Monsieur le Docteur Jean Bénard,
Pour avoir accepté d'être membre du jury de ce travail et pour leurs conseils avisés.
Madame le Docteur Laurence Bonhomme-Faivre,
Pour m'avoir dirigé tout au long de ce projet de recherche passionnant en cancérologie, veuillez trouver l'expression de ma reconnaissance.
Monsieur le Docteur Chadi Abbara et Madame le Docteur Marie-Sophie Noël-Hudson,
Pour votre soutien et votre collaboration, veuillez trouver ici l'expression de mon amitié.
Monsieur le Professeur Robert Farinotti et l'équipe du laboratoire de pharmacie clinique de la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry,
Pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et transmis vos connaissances.
Monsieur le Docteur Gonin, Mademoiselle Mélanie Polrot et l'équipe de l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy,
Pour votre accueil au sein de votre structure et votre sympathie.

Tous mes collègues et amis de l'hôpital Paul Brousse: **Eric, Vincent, Madjid, Christophe, Mahamadou, Marie-Vé, Elodie, Madame Orbach, les oncologues, les internes et l'équipe de l'Unité de reconstitution des chimiothérapies,**
Sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

Je dédie cette thèse à ma famille et à mes amis.

Résumé

La P-glycoprotéine (P-gp) est une protéine transmembranaire de la famille des ATP binding cassette transporteurs. Elle est impliquée dans l'efflux du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire d'une grande variété de médicaments anticancéreux. Elle peut être responsable de la diminution de la biodisponibilité orale et de la concentration intra-tumorale des médicaments qui en sont substrats. Elle peut notamment être surexprimée par les cellules cancéreuses des adénocarcinomes du colon naïfs de tout traitement, suggérant une résistance naturelle de cette tumeur et également après une chimiothérapie.

Notre premier travail *in vivo* a documenté le caractère substrat de la P-gp de l'évérolimus, inhibiteur de mTOR indiqué dans divers cancers (rein, tumeurs neuroendocrines d'oringine pancréatique et sein), jusqu'à maintenant uniquement étudié dans des modèles *in vitro*. Une augmentation significative de l'AUC de l'évérolimus administré par voie orale est observée chez des souris mdr1a-/b- comparées à des souris mdr1a+/1b+. Une amélioration significative de la biodisponibilité orale de l'évérolimus est aussi notée chez des souris prétraitées par le lapatinib (Tyverb®), inhibiteur des tyrosines kinases (EGFR et HER2) indiqué dans le cancer du sein, par rapport aux souris ayant reçues l'évérolimus seul. Ce résultat est accompagné d'une inhibition de l'expression de la P-gp intestinale par le lapatinib mesurée par la technique de Western Blot. Enfin, une étude préclinique menée chez des souris porteuses d'une xénogreffe colorectale mutée KRAS montre une activité anti-tumorale certaine des deux médicaments utilisés seuls et en schéma séquentiel.

Notre seconde étude a montré pour la première fois que le cétuximab (Erbitux®), anticorps anti-EGFR, inhibe la fonctionnalité de la P-gp dans deux lignées cellulaires surexprimant la P-gp (les cellules IGROV-1 et les HEK P-gp) indépendamment de leur statut EGFR et entraîne chez des souris porteuses d'une xénogreffe colorectale une augmentation significative de la biodisponibilité orale et de la concentration intra-tumorale du SN-38, métabolite actif de l'irinotécan (Campto®) administré par voie orale. Le cétuximab étant prescrit en association avec l'irinotécan chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastasé, initialement réfractaire à l'irinotécan, ces résultats pourraient en partie expliquer la réversion de la résistance à l'irinotécan par le cétuximab par une inhibition de l'efflux de la P-gp.

Grâce à l'étude de deux associations de médicaments «lapatinib-evérolimus» et «cétuximab-irinotécan», nous avons démontré l'intérêt de l'étude de l'inhibition de la P-gp avec les traitements les plus récents, notamment son rôle dans l'amélioration de la biodisponibilité orale de chimiothérapies utilisées par voie orale.

Mots clés: evérolimus, lapatinib, cétuximab, irinotécan, P-glycoprotéine, xénogreffe colororectale

Publications

Chu C, Abbara C, Noël-Hudson MS, Thomas-Bourgneuf L, Gonin P, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Disposition of everolimus in mdr1a-/1b- mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice. Biochem Pharmacol. 2009 May 15;77(10):1629-34.

Chu C, Noël-Hudson MS, Boige V, Goéré D, Marion S, Polrot M, Bigot L, Gonin P, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation. Fundam Clin Pharmacol. 2012 Mar 28.

Chu C, Abbara C, Gonin P,, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. A cetuximab pre-treatment with oral irinotecan (CPT-11) increases trough plasma concentration of CPT-11 in mice. Soumis.

Communications orales

Chu C, Noël-Hudson MS, Boige V, Goéré D, Gonin P, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Everolimus and Lapatinib: Pharmacokinetics in mice and Study of therapeutic efficiency in a xenograft model of human colorectal carcinoma. *Frontiers in Immunology Research 2010*

Chu C, Jovelet C, Noël-Hudson MS, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Cetuximab inhibits P-glycoprotein functionality in IGROV-1 human ovarian cancer cell lines *Frontiers in Immunology Research 2011*

Chu C, Abbara C, Noël-Hudson MS, Bénard J, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. *In vivo* and *in vitro* evidence of the effect of Erbitux® on drug substrates of ABCB1 *Frontiers in Immunology Research 2012*

Communications affichées

Chu C, Abbara C, Gonin P, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Disposition of everolimus in mice mdr1a-/1b- and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice. *International Congress on Anti-Cancer Treatment 2009*

Chu C, Jovelet C, Noël-Hudson MS, Bénard J, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. Cetuximab inhibits P-glycoprotein functionality in IGROV-1 human ovarian cancer cell lines *World Congess on Gastrointestinal Cancer 2011*

Abbréviations

AMM: autorisation de mise sur le marché

ATP: adenosine triphosphate

AUC: aire sous la courbe

BCRP (ABCG2): breast cncer protein

C_{max}: concentration maximale

CPT-11: 20-(S)-camptothecin ou irinotécan

EGFR: facteur de croissance épithélial

HAS : Haute Autorité de Santé

HPLC: chromatographie liquid haute performance

ITK: inhibiteur de tyrosine kinase

mTOR: mammalian target of rapamycin

LLOQ: limite de quantification

MDR: multidrug resistance

MFI: moyenne intensité de fluorescence

MRP1 (ABCC1): multidrug resistance-associated protein 1

MRP2 (ABCC2): multidrug resistance-associated protein 2

P-gp (ABCB1): P-glycoprotéine

SN-38: 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin

SVF : sérum fœtal de veau

T_{max}: temps de la cinétique pour lequel la concentration est maximale

$T_{1/2}$: temps de demi-vie d'élimination

Sommaire

INTRODUCTION 10

GENERALITES 15

I. Le cancer colorectal 16

1. Données épidémiologiques 16

2. Prise en charge du cancer colorectal 16

II. La P-glycoprotéine 18

1. Rôle physiologique de la P-glycoprotéine 18

2. Structure moléculaire 18

3. Mécanisme de fonctionnement 20

4. Les interactions médicamenteuses associées à la P-gp 21

5. Polymorphisme génétique 23

6. Multi-drug résistance 25

III. Le récepteur de l'EGF (EGFR) et les thérapies anti-EGFR 27

1. Le récepteur de l'EGF 27

2. Stratégies thérapeutiques développées pour bloquer l'EGFR 31

3. Les médicaments anti-EGFR et la multidrug résistance 31

IV. Médicaments anticancéreux utilisés dans nos travaux 34

1. Irinotécan : inhibiteur de topoisomérase I 34

2. Cétuximab : anticorps anti-EGFR 39

3. Evérolimus: inhibiteur de mTOR 43

V. Modèles murins utilisés dans nos travaux 49

1. Modèle de souris double KO mdr1a-/1b- 49

2. Modèle de xénogreffe de cancer colorectal humain chez la souris nude 50

TRAVAUX PERSONNELS 53

Premier travail: Etude de l'influence du lapatinib sur la P-glycoprotéine: conséquence sur la pharmacocinétique, la toxicité et l'efficacité anti-tumorale de l'evérolimus 54

I. Objectif de l'étude 54

II. Article 1: Disposition of everolimus in mdr1a-/1b- mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice 55
III. Résultats de l'article 1 61
IV. Article 2: Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation 63
V. Résultats de l'article 2 72
VI. Discussion du premier travail 74
Deuxième travail: Etude de l'influence du cétuximab sur la P-gp in vitro et in vivo : conséquence sur la pharmacocinétique de l'irinotécan 77
I. Objectif de l'étude 77
II. Effet in vitro du cétuximab sur la P-gp 78
III. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique de l'irinotécan chez la souris nude saine 93
Article 3 : Cetuximab pretreatment with oral irinotecan prolongs its remaining plasma concentration in mice 93
IV. Résultats de l'article 3 108
V. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale de l'irinotécan chez la souris nude porteuse d'une xénogreffe colorectale humain 109
VI. Synthèse des études pharmacocinétiques chez la souris 118
VII. Expression de la P-gp et de la BCRP tumorale dans la xénogreffe de cancer colorectal par analyse Western Blot 124
VIII. Discussion du deuxième travail 125
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 135

Index des figures

Figure 1: Structure de la P-gp 19
Figure 2: Structure de l'EGFR 27
Figure 3 : Mécanisme d'activation du récepteur EGFR 29
Figure 4: Voies de signalisation en aval de l'EGFR 30
Figure 5: Mécanisme d'action de l'irinotécan 35
Figure 6: Voies métaboliques de l'irinotécan 37
Figure 7: Mécanisme d'action du cétuximab 40
Figure 8: Représentation schématique du mécanisme de l'ADCC induite par le cétuximab 41
Figure 9: Inhibition de l'activité traductionnelle par les inhibiteurs de la protéine mTOR 43
Figure 10: Mécanisme d'action du lapatinib 46
Figure 11 : Expression de la P-gp duodénale dans le groupe témoin et le groupe pré-traité par le lapatinib 62
Figure 12: Western blot de la P-gp duodénale dans le groupe témoin et le groupe pré-traité par le lapatinib 62
Figure 13: Mesure de l'expression de la P-gp dans les cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp 84
Figure 14: Mesure de l'expression de l'EGFR dans les cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp 85
Figure 15: Augmentation de l'accumulation de la doxorubicine dans les cellules sensibles à la doxorubicine (IGROV1-PAR and HEK Mock) comparées aux cellules résistantes à la doxorubicine (IGROV1-DXR and HEK P-gp) 86
Figure 16: Augmentation de l'accumulation de la doxorubicine dans les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp co-traitées par le cétuximab à 1 et 3 µM et la doxorubicine 10 µM par rapport aux cellules IGROV1-DXR and HEK P-gp traitées par la doxorubicine 10 µM seule 87
Figure 17a: Absence d'accumulation de la doxorubicine dans les cellules IGROV1-DXR après 24, 48 et 72 h d'incubation avec du cétuximab à 3 µM suivie de 2 h d'incubation avec de la doxorubicine 10 µM à J4 89
Figure 17b: Légère induction de la P-gp dans les cellules HEK P-gp après 24 h d'incubation avec le cétuximab à 300 nM, 1 et 3 µM suivie de 2 h d'incubation avec la doxorubicin 10 µM à J4 90
Figure 18a: Absence d'effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp dans les cellules IGROV1-DXR après 24 h d'incubation avec du cétuximab à 3 µM 91
Figure 18b: Absence d'effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp dans les cellules HEK P-gp après 24 h d'incubation avec du cétuximab à 300 nM et 3 µM 91
Figure 19 : Effet du cétuximab sut l'affinité de l'UIC2 à la P-gp 92
Figure 20: Pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) 113

Figure 21: Pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *114*

Figure 22: Pharmacocinétiques plasmatiques du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris saine traitées ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *115*

Figure 23: Pharmacocinétiques au niveau de la tumeur du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris saine traitées ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *117*

Figure 24: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques de l'irinotécan chez des souris ayant reçu les deux médicaments par rapport aux souris ayant reçu l'irinotécan seul, selon deux schémas d'administration du cétuximab: en pré-traitement ou en association *120*

Figure 25: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques du SN-38 chez des souris ayant reçu les deux médicaments par rapport aux souris ayant reçu l'irinotécan seul, selon deux schémas d'administration du cétuximab: en pré-traitement ou en association *120*

Figure 26: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques de l'irinotécan et du SN-38 chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab *121*

Figure 27 : Représentation des ratios des concentrations de l'irinotécan chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab dans le plasma et la tumeur *122*

Figure 28: Représentation des ratios des concentrations du SN-38 chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab dans le plasma et la tumeur *123*

Index des tableaux

Tableau 1: Substrats et inhibiteurs de la P-gp *21*

Tableau 2: Lignées cellulaires utilisées dans nos travaux *79*

Tableau 3: Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *113*

Tableau 4: Paramètres pharmacocinétiques dans la tumeur de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *114*

Tableau 5: Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *116*

Tableau 6: Paramètres pharmacocinétiques dans la tumeur du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) *117*

Tableau 7: Expression de la P-gp et de la BCRP dans les échantillons tumoraux de souris contrôles, traitées par l'irinotécan seul et traitées par l'irinotécan et le cétuximab *125*

INTRODUCTION

Au cours de la dernière décennie, les taux de réponse et de survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal ont été augmentés significativement grâce au développement d'une part, des protocoles de chimiothérapie utilisant des molécules standards tels que le 5-fluorouracile, l'irinotécan et l'oxaliplatine et d'autre part, aux thérapies ciblées tels que le cétuximab, le panitumumab et le bévacizumab.

Chez les patients atteints d'un cancer colorectal avancé, aucune thérapie standard n'est efficace après progression sous traitement à base de 5-fluorouracile, d'irinotécan, d'oxaliplatine, de bévacizumab, de cétuximab et de panitumumab. L'étude des résistances à ces traitements et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques sont actuellement les sujets de recherche majeurs dans le domaine de la cancérologie.

Nos travaux effectués au laboratoire de Pharmacie Clinique UPRES EA 4123 à la Faculté de Pharmacie de Paris XI et au laboratoire de Pharmacologie de l'hôpital Paul Brousse (AP-HP) ont porté sur l'influence des médicaments anticancéreux sur la P-glycoprotéine (P-gp ou ABCB1). Cette protéine transmembranaire appartenant à la famille des ATP binding cassette (ABC) transporteurs est impliquée dans le transport des médicaments. Elle est située généralement au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales de nombreux tissus sains: le rein, le système biliaire, le tractus digestif, la barrière hémato-encéphalique, les gonades. Cette pompe d'efflux possède une activité ATPasique lui permettant d'hydrolyser l'ATP intracellulaire et d'utiliser l'énergie générée pour expulser hors de la cellule un grand nombre de substrats. Du fait de son action, une augmentation ou une altération de son activité entraîne une modification du transport des médicaments qui en sont les substrats et donc de leur biodisponibilité dans l'organisme.

La P-gp est connue pour transporter un grand nombre de médicaments anti-cancéreux tels que les anthracyclines, les vinca-alcaloïdes, les taxanes, l'étoposide, la mitoxantrone, les inhibiteurs d'histone déacétylase [1-2]. Cette protéine est ainsi responsable du phénomène MDR, « multidrug résistance » : lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules tumorales, elle diminue la concentration intracellulaire du médicament. Cette protéine peut être surexprimée dans des tumeurs solides naïves de toute

chimiothérapie telles que certains cancers du colon pouvant expliquer la résistance naturelle de ces tumeurs aux traitements anticancéreux [3]. Une augmentation de son expression est observée après l'administration de chimiothérapies et est associée à une progression de la maladie dans le cancer du sein et dans la leucémie [4].

Trois générations d'inhibiteurs de la P-gp ont été developpés pour augmenter la sensibilité des tumeurs chimiorésistantes. Malgré des résultats prometteurs en pré-clinique, ils n'ont pas su trouver leur place en clinique. Plusieurs raisons ont été évoquées : augmentation de la toxicité (toxicité des tissus sains, interactions médicamenteuses), manque d'efficacité (relais de l'activité d'efflux par d'autres transporteurs, concentrations de l'inhibiteur inadéquates par rapport aux concentrations des cellules tumorales) [5].

En parallèle, de récentes études [6-8] sur la recherche du caractère substrat et/ou inhibiteur de la P-gp des médicaments déjà utilisés en tant qu'anti-cancéreux se sont développées. Le fait d'associer deux médicaments anti-cancéreux, l'un substrat et l'autre inhibiteur de la P-gp, s'avère être une stratégie intéressante et, notamment, lorsqu'il s'agit en plus de thérapies ciblées. Ainsi, une toxicité supplémentaire apportée par un inhibiteur spécifique de la P-gp peut être évitée.

Le premier travail présenté dans cette thèse étudie l'influence du lapatinib (Tyverb®), inhibiteur de tyrosine kinase EGFR et HER2 utilisé dans le traitement du cancer du sein métastasé [9], sur la P-gp intestinale et tumorale et, les conséquences sur la pharmacocinétique et l'efficacité anti-tumorale de l'evérolimus (Afinitor®), inhibiteur de mTOR utilisé dans divers cancers avancés (rein, pancréas et sein) [9] chez la souris.

Le caractère substrat de la P-gp de l'evérolimus a été montré *in vitro* chez des cellules endothéliales [10]. Cependant, le caractère substrat de la P-gp de l'evérolimus n'a jamais été montré *in vivo*. Nous avons donc voulu étudier si l'evérolimus était substrat de la P-gp dans un modèle de souris mdr1a-/1b- (soit déficiente de la P-gp). Ensuite, nous nous sommes intéressés à une nouvelle classe de thérapies ciblées : les inhibiteurs de tyrosine kinase. Le caractère inhibiteur de la P-gp du lapatinib a été décrit brièvement *in vitro* en

2006 [11]. Notre hypothèse était donc que le lapatinib pourrait inhiber la P-gp chez la souris et améliorer par conséquent la biodisponibilité orale de l'évérolimus. Des pharmacocinétiques comparées de l'évérolimus administré seul ou après un pré-traitement par le lapatinib chez la souris font l'objet d'une première publication.

L'évérolimus a obtenu son AMM en 2004 sous le nom de Certican® pour la prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une allogreffe rénale ou cardiaque. L'arrivée de cet immunosuppresseur a ouvert de nouvelles voies de recherche sur l'intérêt des inhibiteurs de mTOR en tant qu'anti-cancéreux [12,13]. Suite aux résultats obtenus par nos études pharmacocinétiques, nous avons voulu tester l'efficacité anti-tumorale et la tolérance du lapatinib et de l'évérolimus administrés par voie orale chez des souris porteuses d'une xénogreffe humaine provenant d'un cancer colorectal métastasé et possédant une mutation KRAS. Cette étude préclinique fait l'objet d'une deuxième publication.

Dans un deuxième travail, nous avons évalué l'effet du cétuximab (Erbitux®) sur la P-gp *in vitro*, suivie de l'étude de l'influence du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale de l'irinotécan et du SN-38 (métabolite actif de l'irinotécan) après administration de l'irinotécan par voie orale chez la souris.

Le cétuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Il est indiqué depuis 2004 dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec gène KRAS de type sauvage exprimant le récepteur EGFR associé à une chimiothérapie ou en monothérapie [9]. Le cétuximab en association à l'irinotécan a montré une efficacité supérieure au cétuximab utilisé en monothérapie chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et qui progressent sous une chimiothérapie à base d'irinotécan [14]. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de réversion à la résistance de l'irinotécan restent à ce jour mal connus. La mutation KRAS est un facteur de résistance au traitement du cétuximab [15]. Compte tenu de l'absence de réponse tumorale observée chez plus de 50% des patients ne possédant pas la mutation KRAS, la recherche

d'autres facteurs de résistance au traitement est indispensable. Parmi les agents anti-cancéreux concernés par le phénomène MDR, se trouve l'irinotécan. Il a été effectivement montré que l'irinotécan et le SN-38 sont efflués hors de la cellule par la P-gp et par d'autres transporteurs d'efflux : la BCRP, la MRP1 et la MRP2 [16-18].

Ainsi, l'implication de la P-gp dans la résistance à l'irinotécan fait l'objet de nombreuses recherches : des études *in vitro* de réversion de la résistance, des pharmacocinétiques chez l'animal montrant des augmentations de l'aire sous la courbe de l'irinotécan administré par voie orale, suite à un traitement par un inhibiteur de la P-gp ainsi que des études de polymorphisme génétique chez l'Homme [18-24].

Par conséquent, nous nous sommes intéressés dans ce deuxième travail, à déterminer tout d'abord, si des anticorps monoclonaux anti-EGFR comme le cétuximab pouvaient modifier l'expression et la fonctionnalité de la P-gp *in vitro* ; ce qui pourrait expliquer en partie la réversion à la résistance de l'irinotécan. Enfin, des pharmacocinétiques menées chez des souris nude normales puis porteuses d'une xénogreffe colorectale ont permis de documenter l'influence de cet anticorps sur la biodisponibilité orale et la concentration intra-tumorale de l'irinotécan.

GENERALITES

I. Le cancer colorectal

1. Données épidémiologiques

Le cancer colorectal est le plus fréquent des cancers digestifs. En France, il représente, en 2012, 1 cancer sur 6. Il est situé au troisième rang en terme de fréquence [25]. Il arrive en troisième position chez l'homme et en deuxième position chez la femme. Le taux d'incidence du cancer colorectal est estimé à 40000 nouveaux cas par an. Il est, en 2012, la deuxième cause de mortalité par cancer en France soit presque 17000 décès par an selon les données de la Haute Autorité de Santé (HAS) soit 11% des décès par cancer. Il est également la première cause de mortalité chez les patients âgés de plus de 85 ans. La maladie touche des personnes de plus de 50 ans dans 95% des cas avec un âge moyen au moment du diagnostic de 70 ans chez les hommes et de 73 ans chez les femmes [25,26].

Il s'agit d'un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce. La survie à 5 ans baisse avec le degré d'envahissement (91% pour les stades localisés, 70% pour les stades avec envahissement régional et 11% dans les situations métastatiques). Le taux de mortalité par cancer colorectal a diminué grâce aux progrès dans le diagnostic et grâce aux nouvelles thérapeutiques.

2. Prise en charge du cancer colorectal

Chez un patient non métastasé, la chirurgie est le traitement de première intention pour le cancer colorectal. Selon les recommandations de l'HAS [26], la prise en charge du cancer du colon diffère selon les stades:

- dans les stades I = T1-T2 N0 M0, la chirurgie seule est recommandée.

- dans les stades II = T3-T4 N0 M0, la chirurgie sera associée ou non à une chimiothérapie adjuvante selon les facteurs de risque. En l'absence de facteurs de mauvais pronostic, la chirurgie seule est recommandée. En présence de facteurs de risque de

récidive, le rapport bénéfice/risque d'une chimiothérapie adjuvante (gain de 3% de survie à 5 ans) sera discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire et avec le patient.

- dans les stades III = tous T N1-N2 M0, la chimiothérapie adjuvante est recommandée, en plus de la chirurgie, dans un délai de 8 semaines et durant 6 mois après la chirurgie.

- dans le stade IV = stade métastatique, une chimiothérapie doit être envisagée. Les bénéfices attendus et les effets indésirables doivent être discutés avec le patient. L'efficacité de la chimiothérapie doit être évaluée tant sur le plan clinique qu'en imagerie après 2 à 3 mois de traitement. En cas de réponse, la chirurgie doit être rediscutée. En cas de réponse ou de stabilité, si les métastases restent non resécables, il est possible de poursuivre la chimiothérapie ou de discuter avec le patient d'une pause thérapeutique jusqu'à progression avec réévaluation tous les 2 mois. En cas de progression, deux options sont envisageables: l'arrêt ou le changement de protocole de chimiothérapie.

Les molécules utilisées dans le cadre de l'AMM pour le cancer colorectal sont :

- pour les stades non métastatiques : le 5-fluorouracile, l'oxaliplatine, l'irinotécan, la capécitabine, l'acide folinique, la mitomycine C

- pour les stades métastatiques : l'oxaliplatine, l'irinotécan, le 5-fluorouracile, l'acide folinique, la capécitabine, le raltitrexed, l'uracile-tegafur, la mitomycine C ainsi que des traitements ciblés tels que le cétuximab, le panitumumab et le bévacizumab.

II. La P-glycoprotéine

1. Rôle physiologique de la P-glycoprotéine

La P-gp est une protéine transmembranaire, membre de la superfamille des transporteurs d'efflux ABC (ATP-binding cassette). Cette protéine est située généralement au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales de nombreux tissus sains: le rein, le système biliaire, le tractus digestif, la barrière hémato-encéphalique, les gonades [27]. Elle joue un rôle de détoxification et de protection avec une possibilité de diminution de l'absorption (intestin), d'augmentation de l'élimination (foie) et de diminution de la pénétration dans un organe tel que le cerveau. La P-gp serait aussi exprimée dans le cordon spinal et dans les plexus choroïdes. Bien que ces données soient limitées, la protéine pourrait réguler la pénétration de ces substrats dans ces sites [27].

2. Structure moléculaire

La P-gp est une glycoprotéine de poids moléculaire de 170 kD composée de 1280 acides aminés. Elle est codée par le gène MDR1 localisé sur le chromosome 7 en q21 chez l'homme.

Sur le plan structural, elle est organisée en quatre domaines, spécifiques des membres de la famille des transporteurs ABC:

- deux domaines transmembranaires formant un pore (les domaines TMD : Trans Membrane Domains) comprenant chacun six segments en hélice α insérés dans la bicouche lipidique

- deux domaines intracellulaires impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (les domaines NBD : Nucleotides Binding Domains) situés dans le cytoplasme.

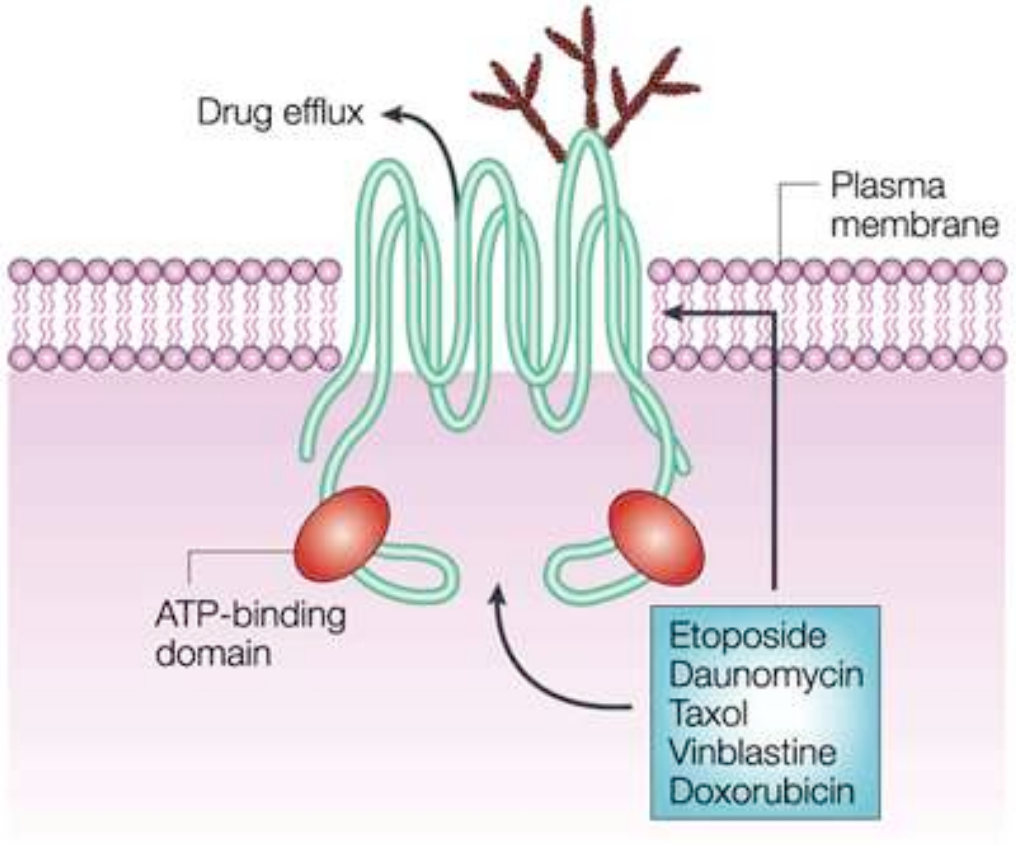


Figure 1: Structure de la P-gp

Trois séquences très conservées chez les membres de cette famille ont été retrouvées:

- Les séquences Walker A et B (appartenant aux domaines NBD) qui sont les sites de liaison de l'ATP. Bien que caractéristiques, ces séquences ne sont pas spécifiques des transporteurs ABC car on les retrouve dans beaucoup d'autres protéines ATPases.

- Une séquence C particulière aux transporteurs ABC, utilisée pour déterminer l'appartenance d'une protéine à cette superfamille. Cette « signature » très spécifique est située entre les sites Walker A et B.

3. Mécanisme de fonctionnement

La protéine agit en tant que pompe ATPase, c'est-à-dire une pompe capable d'expulser, grâce à l'énergie fournie par l'ATP, un grand nombre de composés, de structures et de propriétés chimiques et pharmacologiques très diverses: cytotoxiques, immunosuppresseurs, antipaludéens, antifongiques, inhibiteurs de canaux calciques (voir Tableau 1). Plus récemment, un nombre important d'études montre que la P-gp est responsable de l'efflux de thérapies ciblées tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase que nous détaillerons dans la section II de ce manuscrit.

Substrates			Inhibitors
Antiacids	**β-Adrenoceptor antagonists**	**Immunosuppressants**	**Diverse Inhibitors**
Cimetidine	Bunitrolol	Cyclosporine A	Agents
Ranitidine	Carvedilol	Sirolimus	Verapamil
	Celiprolol	Tacrolimus	Quinidine
Antibiotics	Talinolol		Valspodar (PSC)
Erytromycin	Reserpine	**Opioids**	Cyclosporine
Tetracycline		Loperamide	Ketoconazole
Rifampin	**Ca^{++} Chanel Blockers**	Domperidone	
Levofloxacin	Ditiazem	Morphine	
	Mibefradil	Pentazocine	
Antiemetic		Methadone	
Ondansetron	**Cardiac drugs/Antiarrhythmics**	Asimadoline	
	Digotoxin	Fentanyl	
Antitumor Agents	Digoxin		
Paclitaxel		**Steroids**	
Doxorubicin	**Histamine H1, receptor antagonists**	Dexametasone	
Daunorubicin	Fexofenadine	Methulprednisolone	
Vinblastine	Terfenadine	Aldosterone	
Vincristine		Progesterone	
Actinomycin D	**HIV Proteases Inhibitors**	Hydrocortisone	
Docetaxel	Amprenavir	Cortisol	
Etoposide	Indinavir	Corticosterone	
Imatinib	Nelfinavir		
Teniposide	Saquinavir	**Others**	
	Ritonavir	Colchicine	
		Itraconazole	
		Phenothiazines	
		Ivermectin	

Tableau 1: Substrats et inhibiteurs de la P-gp[27]

Des expériences ont montré que des médicaments décrits comme substrats de la P-gp chez la souris étaient également substrats chez l'homme et chez le chien [27].

4. Les interactions médicamenteuses associées à la P-gp

La découverte du phénotype MDR *(multi-drug résistance)* dans les cellules cancéreuses a permis de mettre en évidence le rôle des transporteurs membranaires dans l'efflux de molécules de classes pharmacologiques et chimiques diverses. Le transport de xénobiotiques par la P-gp apparaît de plus en plus comme un élément clé dans les interactions pharmacocinétiques entre médicaments.

4.1. Effets sur l'absorption des médicaments

Du fait qu'elle soit exprimée au niveau de la surface apicale des entérocytes, la P-gp diminue l'absorption des médicaments pris par voie orale et excrète des principes actifs de la circulation générale à la lumière intestinale. Ainsi, des inhibiteurs de la P-gp peuvent augmenter la biodisponibilité orale des médicaments substrats. Chez le rat, le vérapamil, inhibiteur de la P-gp, augmente la biodisponibilité orale de l'irinotécan de 4,4 fois [20]. Les inducteurs enzymatiques peuvent quant à eux augmenter l'activité ou l'expression de la P-gp et par conséquent diminuer l'efficacité des traitements. Une diminution de 63% de l'aire sous la courbe de l'évérolimus est observée chez des patients ayant reçu une dose orale de 4 mg d'évérolimus après un pré-traitement de 12 jours par la rifampicine, inducteur des CYP450 et de la P-gp, à 600 mg par jour par rapport à ceux ayant reçu l'évérolimus seul [28].

4.2. Effets sur la distribution des médicaments

La modulation de l'activité de la P-gp au sein des barrières hémato-tissulaire, hémato-encéphalique, hémato-testiculaire et fœto-placentaire contribue à modifier la

distribution tissulaire des médicaments. Une inhibition de l'activité de la P-gp conduit à une augmentation de la concentration des médicaments substrats de la protéine dans des organes protégés par ces barrières pouvant induire une toxicité. En revanche, une étude préclinique chez la souris montre que le lapatinib, inhibiteur de tyrosine kinase, indiqué dans le cancer du sein métastatique, pourrait inhiber son propre efflux par la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique et par conséquent augmenter sa concentration intracérébrale après des doses répétées [29]. Ce résultat pourrait en partie expliquer l'activité du lapatinib sur les métastases cérébrales de patientes atteintes d'un cancer du sein [30]. Enfin, de nombreuses tumeurs exprimant la P-gp [3,31], les inhibiteurs de la P-gp s'avèrent être également intéressants pour augmenter la concentration intra-tumorale des médicaments substrats. *In vitro*, le lapatinib entraîne une accumulation du topotécan, substrat de la P-gp, dans des cellules exprimant la BCRP (un autre transporteur d'efflux) ou la P-gp, De plus, cette association a montré une efficacité accrue dans des xénogreffes de cancer du sein HER+. Les analyses pharmacocinétiques chez l'homme montrent également que le lapatinib augmente la concentration plasmatique du topotécan [32].

4.3. Effets sur l'élimination des médicaments

La P-gp est également exprimée dans le tractus biliaire et uro-génital. A la surface des hépatocytes des canalicules biliaires, elle participe à l'excrétion des médicaments dans la bile. Au niveau rénal, la P-gp est présente à la surface des cellules endothéliales des tubules rénaux, elle joue donc aussi un rôle dans l'excrétion urinaire des médicaments. Il a été montré que l'irinotécan et son métabolite actif (SN-38) sont tous deux substrats de la P-gp [16]. Ces deux composés sont éliminés via la P-gp, aussi bien au niveau de la membrane intestinale que de la membrane des canicules biliaires. Par exemple, le vérapamil diminue de moitié l'excrétion biliaire de l'irinotécan, chez le rat [20].

5. Polymorphisme génétique

Du fait de son rôle pharmacologique, la P-gp empêche naturellement les médicaments qui sont ses substrats d'atteindre leur cible en les effluant hors du compartiment intracellulaire. Nous allons voir que du fait de son caractère polymorphique, les mutations de la P-gp peuvent également influencer la variabilité interindividuelle face à la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments substrats.

Le gène MDR est sujet à un polymorphisme génétique et, de ce fait, a fait l'objet d'études [33-37]. Après analyse de 48 exons (partie codante du gène) du gène MDR1, 48 SNPs (single nucleotide polymorphism) ont été décrits et correspondent à des variations mineures du génome [33]. Les SNP les plus fréquemment retrouvés sont: ABCB1 2677G>T et 3435C>T. Les fréquences alléliques de ces SNP changent considérablement d'un groupe ethnique à l'autre [38]. La fréquence de ces SNP dépend de l'origine ethnique de la population étudiée : caucasienne, africaine, afro-américaine ou asiatique. L'allèle T du SNP 3435 est relativement fréquent dans les populations caucasiennes et asiatiques (environ 50 %). La répartition des génotypes est de 50 % de CT, 25 % de CC et 25 % de TT [39]. Bien qu'elle aboutisse à une mutation silencieuse (donc pas à un changement d'acide aminé de la P-gp), la variante 3435 C>T influence l'expression de l'ARN messager en modifiant sa stabilité ainsi que la spécificité de la P-gp vis-à-vis de ses substrats [38]. La variante 2677 G>T est quant à elle fonctionelle, et aboutit à un changement d'acide aminé (Ala893Ser) dans la P-gp.

5.1. Caractère prédictif du gène mdr dans le cancer colorectal

Les études de polymorphisme génétique évaluant le caractère prédictif des haplotypes de la P-gp sont nombreuses et donnent des résultats divergents

Deux études en 2008 ont observé que le polymorphisme des allèles G2677T et C3435T n'est pas un facteur de risque que ce soit dans le cadre du cancer du colon sporadique [33] et/ou chez des patients diagnostiqués au stade de Dukes B2 ou C [34].

Les résultats de Balcerczack *et al.* suggèrent que l'allèle T(1236) seul et l'haplotype réunissant les allèles T(1236)-G(2677)-C(3435) du gène MDR sont des facteurs de bon pronostic dans le cancer colorectal. Une augmentation significative de la fréquence de l'allèle T(1236) est en effet observée chez les patients diagnostiqués aux stades T1/T2 (89.7%) et M0 (81.6%) par rapport aux patients diagnostiqués aux stades T3/T4 (68.2%) et M1 (47.4%). Aussi, l'haplotype T(1236)-G(2677)-C(3435) est détecté uniquement chez les patients atteints de cancer colorectal non métastasé [35].

Ainsi, l'âge des patients, l'ethnie, le stade de la maladie seraient donc des critères essentiels à prendre en compte. Egalement, d'autres SNP pourraient influer sur l'expression ou la fonction de la P-gp. L'analyse d'haplotype serait un test plus puissant pour trouver des associations entre l'activité de la P-gp et le risque de maladie que l'analyse des SNP seuls [35].

5.2. Influence du polymorphisme du gène mdr sur l'efficacité des traitements anti-tumoraux dans le cancer colorectal

Les études de l'influence du polymorphisme MDR sur l'efficacité des traitements anti-cancéreux dans le cancer colorectal [22,36,37] sont nombreuses. Il a été décrit, *in vivo* chez l'homme, que le polymorphisme de l'allèle 1236 du gène codant pour la P-gp influe sur la pharmacocinétique de l'irinotécan et du SN-38 chez des patients atteints de cancers colorectaux et traités par une chimiothérapie à base d'irinotécan. En effet, le polymorphisme homozygote de l'allèle 1236C>T a été associé à une augmentation significative de l'exposition à l'irinotécan ($p = 0,038$) et de son métabolite actif SN-38 ($p = 0,031$) [22]. Il a été observé dans une étude rétrospective, incluant 140 patients traités par l'irinotécan et le 5-fluorouracile pour un cancer colorectal métastasé (mCCR), une toxicité précoce pour les patients porteurs du génotype ABCB1 3435 T/T (OR=3,79 ; IC 95%=1,09-

13,2), et, une diminution de la réponse au traitement (43 vs 67%, p = 0,027) associé un temps de survie écourté (OR=1,56 ; IC 95%=1,01-2,45) pour les patients porteurs au moins des haplotypes 1236T-2677T-3435T [36]. Enfin, une étude évaluant l'influence du polymorphisme C3435T sur la réponse thérapeutique chez 17 patients traités par le cétuximab et l'irinotécan pendant 3 mois pour un cancer colorectal avec métastases hépatiques a montré que: deux patients présentaient une progression de la maladie (1 TT et 1 CT), 8 patients présentaient une stabilisation de leur maladie (5 CC et 3CT) et cinq patients répondaient partiellement (3 CC et 2 CT). Plus important, 2 patients (2 TT) présentaient une réponse complète et étaient toujours en vie 5 ans après le début de la chimiothérapie ce qui suggère que la combinaison du génotype KRAS sauvage et MDR1 3435 TT serait un facteur de bon pronostic. Les auteurs soulèvent l'hypothèse du mécanisme de réversion de la résistance de l'irinotécan par le cétuximab par inhibition de l'efflux de la P-gp [24].

6. Multi-drug résistance

Une surexpression de la P-gp à la surface des cellules cancéreuses est responsable du phénomène de multi-drug résistance : la P-gp efflue les médicaments qui sont ses substrats hors de la cellule cancéreuse. Ce phénomène est responsable d'une résistance croisée entre différents agents anti-cancéreux (doxorubicine, irinotécan, mitoxantrone, méthotrexate) [40,41], ce qui pourrait expliquer pourquoi la combinaison de plusieurs traitements ayant des cibles d'action différentes reste inefficace chez certains patients [1]. Les études *in vitro* et *in vivo* démontrant l'implication de la P-gp dans la résistance aux traitements anticancéreux sont aujourd'hui très nombreuses et clairement définies [1-4]. Très tôt, des équipes de chercheurs ont montré que le taux ARN de la P-gp était généralement élevé dans des cancers naïfs de toute chimiothérapie tels que les cancers du colon, du rein, de la glande cortico-surrénale, hépatocellulaires, du poumon à non petites cellules et les leucémies [3,42], impliquant la P-gp dans la résistance intrinsèque de ces cancers aux médicaments substrats de la P-gp. Des études chez l'homme ont également démontré que l'expression de la P-gp peut être induite par une exposition au long cours à un médicament substrat. Des

biopsies obtenues chirurgicalement chez des patients au début et à la fin d'une perfusion de doxorubicine dans le poumon ont montré que le niveau d'expression de la P-gp pouvait augmenter de 3 à 15 fois [43]. Les études les plus reproductibles sur l'expression tumorale de la P-gp sont retrouvées dans la leucémie. La P-gp est exprimée dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë chez 30 % des patients au moment du diagnostic et chez 50 % des patients en rechute. L'expression plus faible de la P-gp (17%) dans les cellules leucémiques des patients ayant moins de 35 ans, comparé aux patients plus âgés (35%) pourrait en partie expliquer les meilleures réponses thérapeutiques chez les patients les plus jeunes [4]. Les études évaluant la contribution de la P-gp dans la résistance des tumeurs solides traitées sont plus hétérogènes. Ceci peut être attribué au manque d'uniformité des méthodes pour mesurer l'expression de la P-gp [44] et à la difficulté de mesurer uniquement l'expression de la P-gp du tissu tumoral sans prélever du tissu sain [1]. Les résultats les plus probants sont observés dans le cancer du sein. Une méta-analyse effectuée dans le cancer du sein conclue que l'expression de la P-gp a pu être détecté chez 41 % des patients avec une augmentation du taux d'expression de la protéine d'efflux après traitement par chimiothérapie [4]. L'intervention d'autres transporteurs d'efflux dans la multi-drug résistance tels que la MRP et la BCRP a également été étudiée. Un taux élevé de la MRP est retrouvé dans les cancers du poumon avec une incidence de 80% des cancers du poumon à petites cellules et 100% des cancers du poumon à non petites cellules [4]. Enfin, la diminution d'expression de transporteurs d'influx entrainant également une diminution de la concentration intracellulaire des chimiothérapies est également notée [45].

III. Le récepteur de l'EGF (EGFR) et les thérapies anti-EGFR

1. Le récepteur de l'EGF

L'EGFR appartient à la famille des récepteurs tyrosines kinases ErbB. Cette famille possède 3 membres catalytiquement actifs : les récepteurs de facteur de croissance humain ErbB1(ou EGFR), ErbB2 (ou HER2) et ErbB4. Le quatrième membre : ErbB 3 est inactif [45,46]. Les ligands, une fois liés aux récepteurs, entraînent la dimérisation de ces derniers. L'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des récepteurs conduit à la phosphorylation des résidus tyrosines kinases cytoplasmiques aboutissant à une cascade de réactions participant à la transcription de protéine anti-apoptotique jouant ainsi un rôle important dans la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire.

1.1. Structure

L'EGFR est une protéine transmembranaire de 170 kDa (comme la P-gp) composée de trois domaines (voir Figure 2): un domaine de liaison du ligand extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire doté d'une tyrosine kinase [46,47].

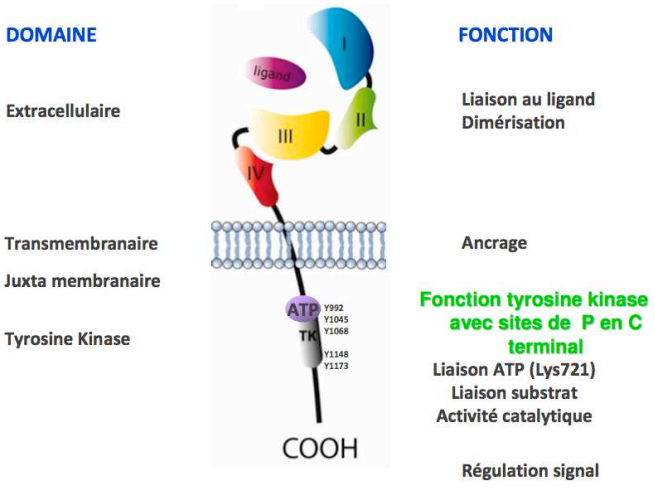


Figure 2: Structure de l'EGFR

Le premier domaine extracellulaire est composé de 621 acides aminés. Il se décompose en 4 sous-domaines I, II, III et IV.

Les domaines I et III (appelés également L1 et L2 pour « Ligand Binding ») permettent la fixation du ligand. Les domaines II et IV contiennent des séquences riches en cystéines (appelés également CR1 et CR2 pour « cystein-rich »). Le domaine II contient le « bras de dimérisation ». Lorsque le récepteur se trouve à l'état monomérique en absence de fixation de ligand, le bras de dimérisation est enfoui dans le récepteur via une interaction avec le domaine IV ne permettant pas une dimérisation du récepteur. La fixation d'un ligand entraîne un pontage entre les domaines I et III permettant un réarrangement profond du récepteur et une exposition du bras de dimérisation. Ce bras ainsi libéré permet au récepteur une interaction avec les autres récepteurs de la famille ErbB (voir Figure 3). L'appariement de deux récepteurs identiques constitue une homodimérisation alors qu'une hétérodimérisation implique la participation de deux récepteurs différents.

La région transmembranaire est composée d'une courte séquence de 23 acides aminés. Le caractère hydrophobe de ces acides aminés permet l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique. Le domaine intracytoplasmique (542 acides aminés) est ensuite composé : du domaine juxtamembranaire (rôle prépondérant dans la régulation de l'activité des récepteurs ErbB, [48], suivi du domaine à activité tyrosine kinase, très conservé entre les différents récepteurs de la famille ERbB (59 à 81% d'homologie), puis, du domaine C-terminal, riche en site de phosphorylation liant spécifiquement les protéines contenant les domaines SH2 (SrcHomologydomain 2) ou PTB (PhosphoTyrosinBinding) nécessaires à la transduction du signal. Avant la liaison de l'EGF sur son site de fixation, la boucle d'activation située au sein du domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase adopte une conformation inaccessible à la fois pour le substrat et pour l'ATP. La modification conformationnelle engendrée par la fixation du ligand dévoile la poche de fixation de l'ATP et permet la dimérisation du récepteur au niveau intracytoplasmique.

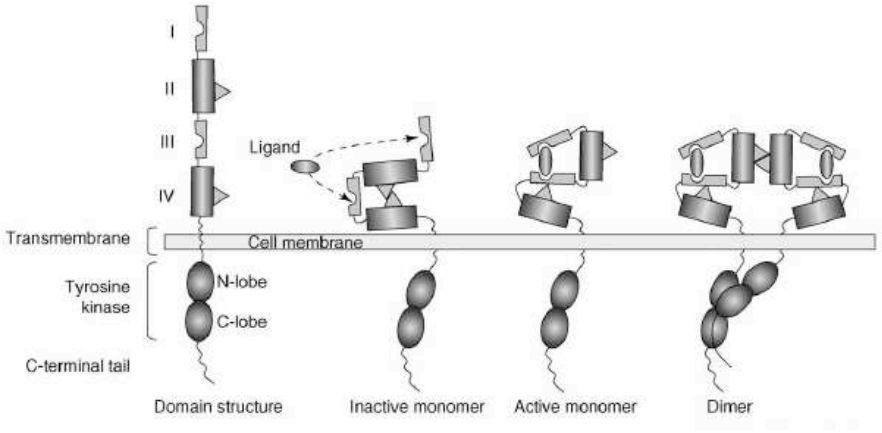


Figure 3 : Mécanisme d'activation du récepteur EGFR[47]

1.2. Ligands

Les ligands des récepteurs ErbB peuvent être classés en fonction de leur sélectivité pour les récepteurs. L'Epidermal Growth Factor (EGF), le Transforming Growth Factor-α (TGFα), l'amphiréguline et l'épigène se lient préférentiellement à l'EGFR ; la bêtacelluline, l'heparin-binding GF et l'épiréguline se lient à l'EGFR et à ErbB4 ; les neurorégulines (1-4) ne se fixent qu'à ErbB3 et/ou ErbB4 [48]. Ces ligands endogènes sont synthétisés sous forme de pro-ligands à faible affinité pour le récepteur. Le clivage des précurseurs membranaires de ces facteurs de croissance est dû à l'activation de métalloprotéases qui va permettre de libérer ces ligands dans le milieu extracellulaire. Il a été rapporté que la nature du ligand contrôle pour une part la nature du dimère ErBb qui sera formé. Par exemple, le TGFα et l'épiréguline favoriseraient la dimérisation d'HER2 avec l'EGFR, tandis que la fixation des neurorégulines sur ErbB3 ou ErbB4 va favoriser leur hétérodimérisation avec HER2.

1.3. Voies de signalisation médiées par l'EGFR

Une fois qu'il y a eu fixation du ligand sur le récepteur et dimérisation du récepteur, l'activité biologique résulte de l'activité tyrosine kinase intracellulaire du récepteur. La dimérisation des récepteurs entraînent en effet une autophosphorylation des tyrosines kinases suivie d'un recrutement et l'activation des seconds messagers, protéines possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines : domaine SH2 (Src homology domain 2) et PTB (phosphotyrosine binding). Ces messagers entraînent l'activation de voies principales de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire: 1/ voie des PI3K/AKT (inhibant des protéines pro-apoptotiques comme Bcl2 et/ou activant la voie mTOR/p70S6K impliquée aussi dans la régulation de l'apopotose et la croissance cellulaire), 2/ voie Ras/MAPK (rôle dans la prolifération cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et par conséquent la migration et la différenciation), 3/ voie de JAK/STAT3 (impliquée dans la prolifération et l'angiogenèse) et 4/ voie Src/PLCγ (activant la survie cellulaire via NFκB) [47].

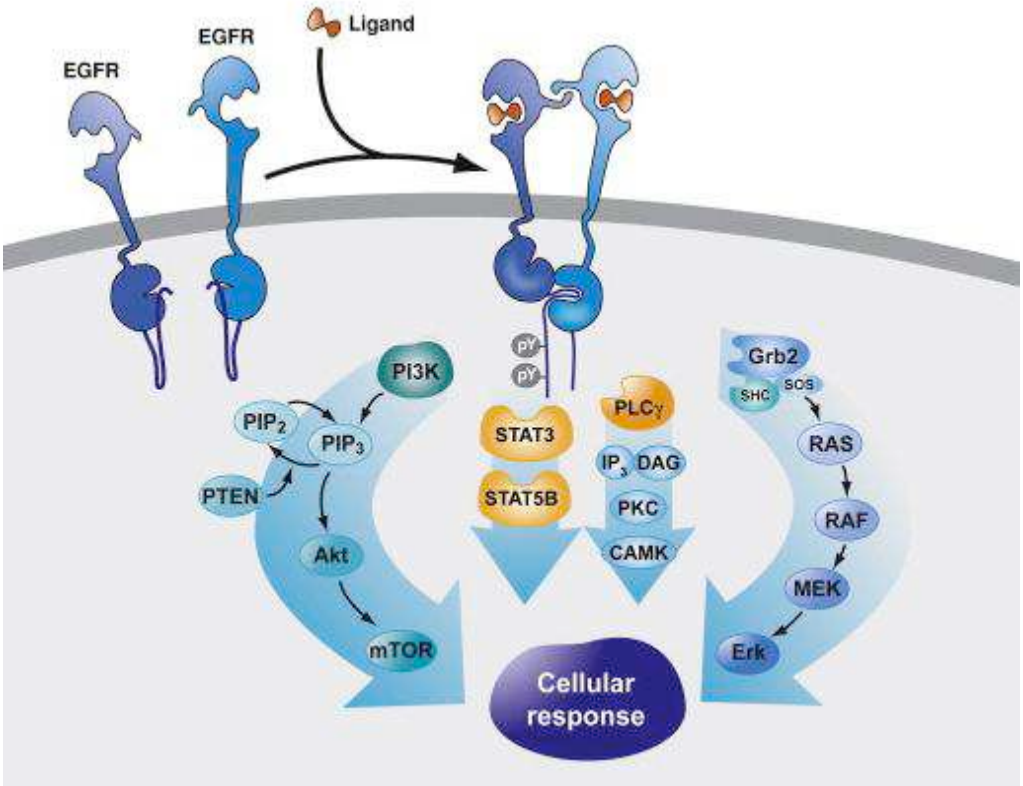


Figure 4 : Voies de signalisation en aval de l'EGFR

2. Stratégies thérapeutiques développées pour bloquer l'EGFR

L'EGFR contribue au développement tumoral via ses effets sur la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et l'induction de l'angiogenèse. La fréquence des anomalies du récepteur EGFR (surexpression, mutation, régulation défectueuse, stimulation anormale par leurs ligands) dans de nombreux types de cancer en a fait très tôt une cible pour des nouvelles thérapies anti-tumorales [49]. Deux familles de médicaments actuellement sur le marché ciblent l'EGFR : les inhibiteurs de tyrosine kinase et les anticorps anti-EGFR. Les mécanismes d'action de ces deux familles seront détaillés dans la suite de ce manuscrit à l'aide de deux représentants utilisés, en essais cliniques ou dans le cadre de l'AMM, dans le cancer colorectal: le lapatinib (ITK) et le cétuximab (Ac anti-EGFR).

3. Les médicaments anti-EGFR et la multidrug résistance

3.1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) anti-EGFR et la multi-drug résistance

L'utilisation des ITK en oncologie augmentant progressivement, la résistance à ces traitements est actuellement l'objet de nombreuses recherches [50]. Les mutations du récepteur tyrosine kinase aboutissant, soit à un accès impossible de l'ITK au domaine ATPasique, soit à une activation spontanée (c'est à dire sans fixation du ligand sur le récepteur) de la voie de signalisation, sont les mécanismes de résistance aux ITK les plus rapportés.

La multi-drug résistance a également été décrite comme l'un des mécanismes à la résistance aux ITK [49,50]. Des études récentes ont en effet montré que les ITK pouvaient être substrats ou modulateurs de la P-gp et de la BCRP [45,51,52].

Ainsi, les ITK étant substrats des transporteurs d'efflux, la multi-drug résistance participe à leur résistance. Paradoxalement, certains ITK étant inhibiteurs des mêmes transporteurs, ils peuvent jouer un rôle dans la réversion de la multi-drug-résistance.

Les réversions à la résistance aux médicaments substrats par la P-gp et la BCRP par les ITK anti-EGFR ont été décrites *in vitro*. Le géfitinib inhibe la BCRP et réverse la résistance au SN-38 dans des cellules surexprimant la BCRP [52]. L'erlotinib réverse aussi la résistance de la mitoxantrone et du SN-38 dans des cellules HEK 293 surexprimant la BCRP [51]. *In vivo*, le géfitinib augmente la biodisponibilité orale de l'irinotécan chez la souris [52]. Des études publiées à partir de 2008 viennent confirmer le caractère substrat et inhibiteur de la P-gp du lapatinib, décrits dans nos travaux présentés dans la suite de ce manuscrit [29,53]. Le lapatinib est capable de réverser la résistance à la doxorubicine dans des cellules surexprimant la P-gp [53]. Il a également été montré que le lapatinib augmente l'activité cytotoxique du paclitaxel dans un modèle de xénogreffe de souris créé à partir de cellules KBv200 (dérivées d'un cancer épidermoïde humain) surexprimant la P-gp [53].

3.2. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR et la multi-drug résistance

En 2012, l'interaction des anticorps monoclonaux avec les transporteurs d'efflux participant à la multi-drug résistance n'avait pas été mise en évidence. Cependant, en empêchant la fixation de l'EGF sur son récepteur, les anticorps monoclonaux tels que le cétuximab et le panitumumab suppriment l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs, et donc, inhibent les propriétés biologiques des ligands. Une fixation de l'EGF sur son récepteur entraîne, comme nous l'avons vu précédemment, une activation de la voie des PI3K/AKT, la voie Ras/MAPK, la voie de JAK/STAT3 et la voie Src/PLC. Des interactions entre la P-gp et des protéines enzymatiques situées en aval de ces voies de signalisation telles que la PLC et la NF-kappa B ont déjà été décrites [54,55]. Dès 1998, Yang *et al.* montrent que l'expression de l'EGFR est augmentée de 27 fois dans des cellules mammaires MCF-7 surexprimant la P-gp par rapport aux cellules MCF-7 parentales [54]. Une exposition des cellules MCF-7 surexprimant la P-gp avec de l'EGF entraîne une augmentation de l'efflux de la vinblastine de 25 à 40%. De plus, il a été observé que la phosphorylation de la P-gp était augmentée de 20 à 50% après une exposition de ces cellules à l'EGF. Cette augmentation de la phosphorylation est accompagnée par une stimulation de l'activité de la PLC. Les auteurs concluent que l'EGF peut moduler la

phosphorylation et la fonction de la P-gp, et, suggèrent que cet effet peut être initié par l'activation de la PLC [54].

NF-kappa, facteur de transcription situé en aval des cascades de signalisation de l'EGFR, est connu comme induisant l'expression de la P-gp [55]. Par conséquent, ce résultat pourrait en partie expliquer que deux études *in vitro* montre que l'EGF pourrait augmenter le taux d'expression de l'ARN de la P-gp [56,57]. Ainsi, en exposant une culture primaire d'hépatocytes à l'EGF pendant 1 à 3 jours, une diminution de la concentration intracellulaire de la rhodamine (substrat de la P-gp) de 10 à 40% a été observée ; cet efflux pouvant être reversé par le vérapamil [57].

IV. Médicaments anticancéreux utilisés dans nos travaux

Deux types de médicaments anticancéreux sont utilisés pour traiter les cancers du côlon: les médicaments de chimiothérapie agissant sur les mécanismes de la division cellulaire et les thérapies ciblées bloquant des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses.

Huit molécules de chimiothérapie (le 5-fluorouracile, la capécitabine, le tégafur uracile, l'oxaliplatine, l'irinotécan, le ralitrexed, l'acide folique, la mitomycine C) et trois traitements ciblés (le bévacizumab, le cétuximab et le panitumumab) sont actuellement utilisées dans le cancer colorectal. Parmi les molécules ayant l'AMM dans le cancer colorectal métastasé, nous avons étudié l'irinotécan et le cétuximab. De plus, nous nous sommes intéressés à deux autres médicaments : le lapatinib et l'évérolimus étudiés en essais clinique dans le cancer colorectal [58].

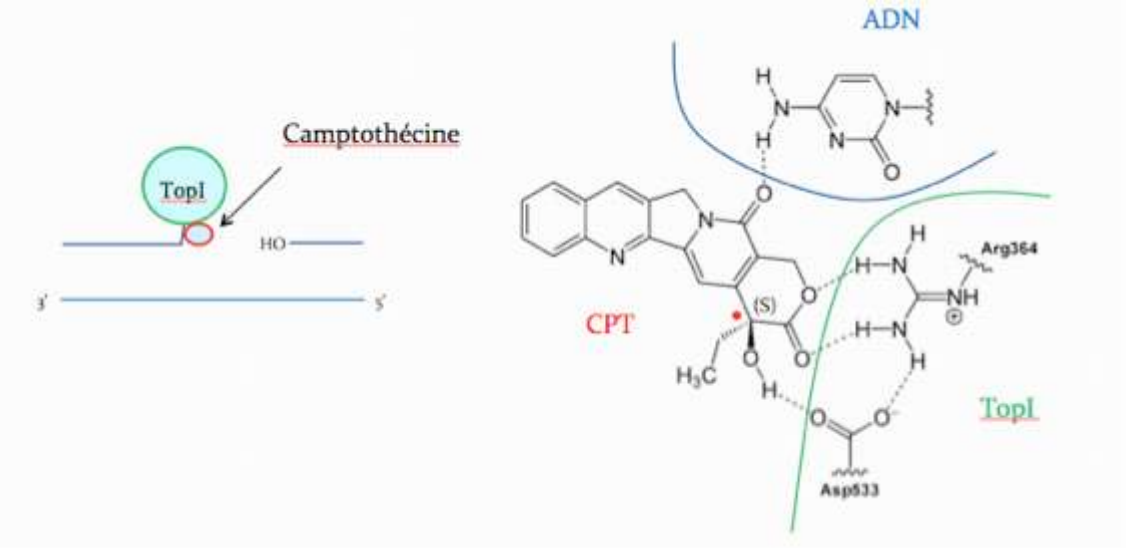
1. Irinotécan : inhibiteur de topoisomérase I

1.1. Mécanisme d'action

L'irinotécan, 20-(S)-camptothecin (CPT-11), est un dérivé hémisynthétique de la campthothécine, alcaloïde cytotoxique [59] extrait d'un arbre chinois appelé également arbre de vie (*Camptotheca acuminata*) utilisé en médecine traditionnelle. L'irinotécan exerce son activité cytotoxique sur de nombreuses lignées tumorales [60] en inhibant la topoisomérase I, enzyme ubiquitaire contrôlant la structure topologique de l'ADN, essentielle lors des phases de réplication et de transcription. Le rôle de la topoisomérase I est de couper transitoirement l'ADN pour permettre la relaxation de l'ADN super enroulé dans le noyau et ainsi, le passage des polymérases chargées de la réplication et de la transcription de l'ADN. Comme nous le montre la figure 5, l'irinotécan stabilise le brin ou

l'ouverture du brin d'ADN et en empêche la « refermeture » ou la « réparation ». La molécule d'ADN est alors brisée de façon permanente et la réplication cellulaire s'en trouve inhibée. L'irinotécan est converti en métabolite actif, le SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), par les carboxylestérases 1 et 2. Ces enzymes sont à la fois actives dans le tissu colorectal sain et tumoral [60,61]. Le SN-38 est approximativement 100 à 1000 fois plus cytotoxique que la prodrogue [61].

1ère étape : Fixation de l'irinotécan sur le complexe ADN/Topoisomérase I



2ème étape : Collision avec la fourche de réplication

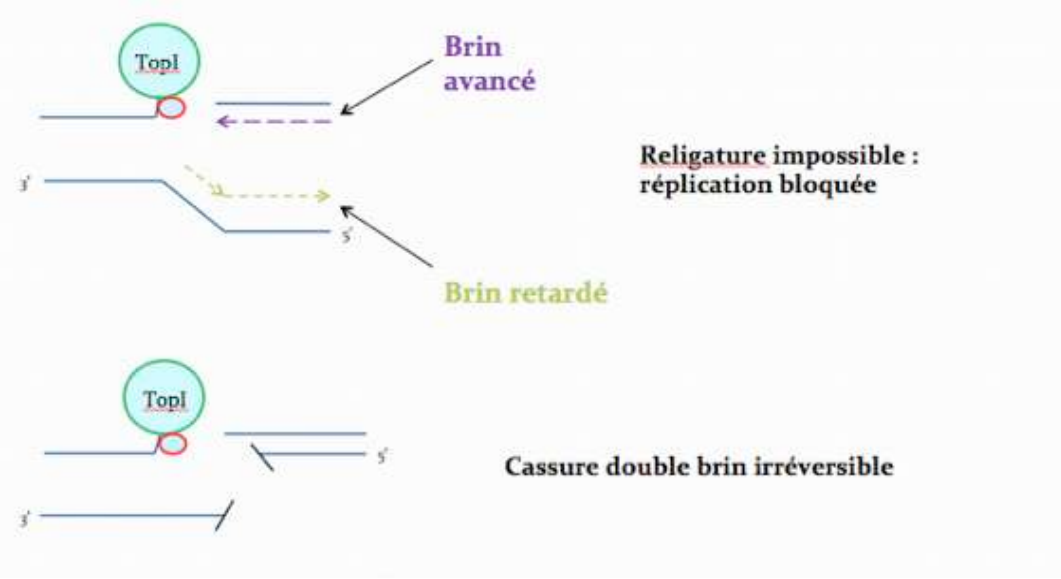


Figure 5: Mécanisme d'action de l'irinotécan

1.2. Données pharmacocinétiques

Absorption et biodisponibilité

L'irinotécan a d'abord été donné par voie orale dans les études de phase I [62,63]. Les résultats ont montré qu'il possèdait une biodisponibilité orale relativement faible (8%) [56], notamment à cause des transporteurs d'efflux. Par conséquent, ce médicament est administré par voie intraveineuse. Par ailleurs, l'utilisation de l'irinotécan par voie orale et les tentatives pour améliorer sa biodisponibilité orale font l'objet de nombreuses études [19-21]. Chez la souris, par voie orale, le pic d'absorption est à 1h et à 15 min par voie IV [19]. La biodisponibilité orale de l'irinotécan est de 25% chez la souris [19] et 33 % chez le rat [20].

Distribution

In vitro, la liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 65 % pour l'irinotécan et de 95 % pour le SN-38.

Métabolisme

L'irinotécan est converti en un métabolite actif, le SN-38 possédant un pouvoir cytotoxique 100 à 1000 fois supérieur à la prodrogue [64]. L'irinotécan et le SN-38 sont métabolisés par de nombreuses enzymes polymorphes conduisant à des pharmacocinétiques complexes [65-67]. L'irinotécan est métabolisé en SN-38 par les carboxylestérases (CES) types 1 et 2. Chez l'Homme, la CES 2 comparée à la CES 1, a 12,5 fois plus d'affinité pour l'irinotécan et a une activité 26 fois supérieure.

Les CES 1 et 2 sont présentes dans le foie, les intestins [68,69]. Une analyse immuno-histochimique de 154 biopsies humaines effectuées à partir de 18 types de tumeurs différentes et de 60 tissus sains, a montré que la CES 2 était exprimée dans 66% des tumeurs (d'une manière importante dans les carcinomes papillaires de la thyroïde et d'une manière plus modérée dans les cancers du pancréas, de l'oesophage, du rein, du colon, du foie, de l'utérus, de l'ovaire de la peau et de l'estomac) et 92% des tissus sains. En général,

l'expression de la CES 2 était plus importante dans les tissus sains comparée à celle des tissus tumoraux associés [61].

Parallèlement à la formation du SN-38, l'irinotécan est transformé en deux métabolites inactifs : l'APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic-acid)-1-piperidino]-carbonyloxycampthotecin) et le NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino)carbonyloxy-camptothecin) par les cytochromes CYP3A4 and CYP3A5. Les métabolites APC et NPC peuvent à leur tour être convertis en SN-38 par les CES 1 et 2 [65,66].

Le SN-38 est ensuite glucuronoconjugué au niveau hépatique par une uridine diphosphate glucuronosyltransférase, isoforme 1A1 (UGT1A1), en un métabolite hydrophile inactif (le SN-38G) qui sera ensuite éliminé facilement par voie biliaire et dans les urines. Le SN-38G peut être déconjugué par les glucuronidases hépatiques et intestinales (par des ß-glucuronidases bactériennes) en SN-38 [65].

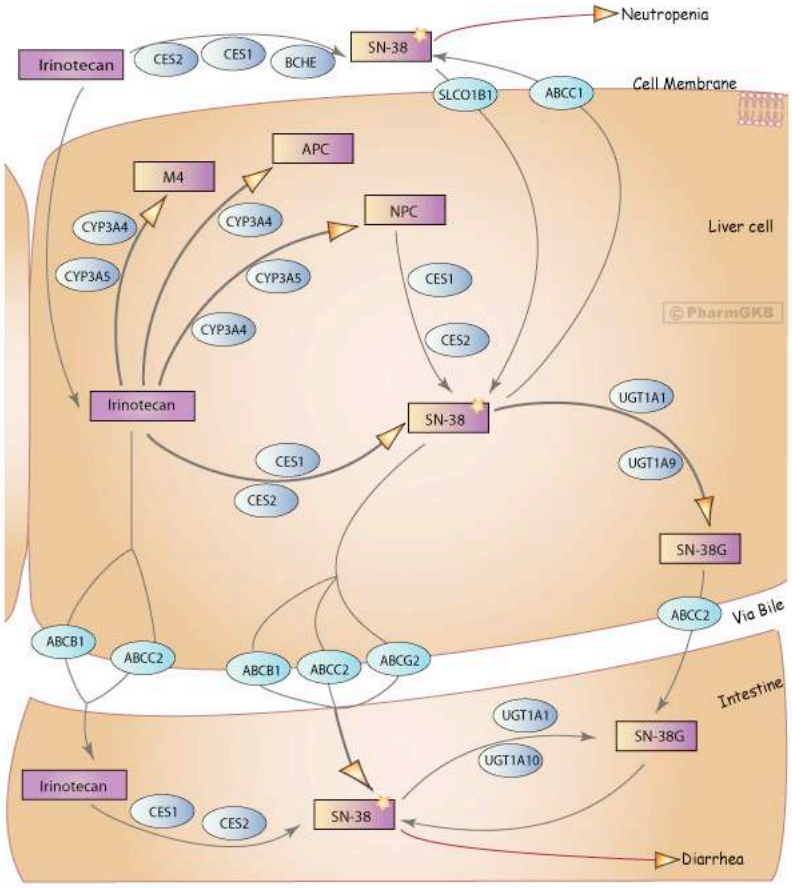


Figure 6 : Voies métaboliques de l'irinotécan [17]

Ainsi, les activités ß-glucuronidases et carboxylestérases sont observées à la fois dans le tissu colorectal normal et tumoral ce qui contribue à l'activation de l'irinotécan en SN-38 [61,65,67].

L'irinotécan et le SN-38 sont également substrats de la P-gp (ABCB1), de la BCRP (ABCG2), de la MRP1 (ABCC1) et de la MRP2 (ABCC2) [16,17,61].

Distribution et Excrétion

Chez l'Homme, le profil d'élimination de l'irinotécan est biphasique ou triphasique [9]. La demi-vie plasmatique moyenne de la première phase du modèle triphasique est de 12 minutes, celle de la seconde phase de 2,5 heures et la demi-vie de la phase terminale de 14,2 heures. Le SN-38 a montré un profil d'élimination biphasique avec une demi-vie d'élimination terminale moyenne de 13,8 heures. Chez l'Homme, 55 % de la dose d'irinotécan administrée par voie intraveineuse est excrétée sous forme inchangée, dont 33 % principalement dans les fécès via la bile et 22 % dans les urines. Environ 44% est éliminée après biotransformations. Deux voies métabolisent chacune au moins 12% de la dose :

- l'hydrolyse par les carboxylestérases avec formation du métabolite actif, le SN-38, qui est principalement éliminé par glucuronidation, puis par excrétion biliaire et rénale (moins de 0,5% de la dose d'irinotécan).
- L'oxydation dépendante du cytrochrome P450 3A, aboutissant à l'ouverture extérieure du noyau pipéridine avec la formation de dérivés inactifs : APC et NPC.

Chez la souris, la demi-vie d'élimination de l'irinotécan est d'environ 1h et celle du SN-38 de 2h.

1.3. Indications de l'AMM en 2012

L'irinotécan est indiqué dans le traitement des cancers colorectaux avancés [9]:
en monothérapie après échec d'un traitement antérieur ayant comporté du 5-FU ou avec le 5-FU et l'acide folinique chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie antérieure pour le stade avancé de leur maladie.

L'irinotécan est également indiqué dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques [9]:

- avec le 5-FU, l'acide folinique et le bévacizumab en traitement de première ligne
- **avec le cétuximab** dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec gène KRAS de type sauvage exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), n'ayant pas reçu de traitement préalable pour une maladie métastatique **ou après échec d'une chimiothérapie à base d'irinotécan**

2. Cétuximab : anticorps anti-EGFR

2.1. Mécanisme d'action

Le cétuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal IgG chimérique murin/humain (35/65%) dirigé contre le domaine extracellulaire de l'EGFR. Cet anticorps a été développé en combinant les régions variables de l'anticorps précurseur de souris (mAb 225) avec les régions constantes de l'immunoglobuline humaine G1 afin de réduire une éventuelle réponse immunologique anti-murine chez les patients [14].

L'anticorps exerce son activité cytotoxique à l'aide de plusieurs mécanismes. Le mécanisme majeur est l'interférence induite par le cétuximab sur la liaison-récepteur. De plus, la liaison du cétuximab au récepteur peut induire l'internalisation et la dégradation de l'EGFR. Enfin, il peut exercer une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (phénomène ADCC).

Le cétuximab interagit avec la partie extracellulaire de l'EGFR au niveau de son domaine III, empêchant la liaison du ligand sur ce domaine (voir Figure 7). Cet encombrement stérique empêche le récepteur d'adopter la conformation dépliée nécessaire à sa dimérisation. De plus, en empêchant le ligand de se fixer sur son récepteur, le cétuximab bloque l'activation des cascades de signalisation en aval du récepteur responsables de la survie cellulaire, de l'angiogenèse et du potentiel métastatique des cellules. Le cétuximab est hautement spécifique de l'EGFR avec une affinité cinq à dix fois supérieure que celle avec les ligands naturels de l'EGFR, tels que l'EGF ou le TGF-α.

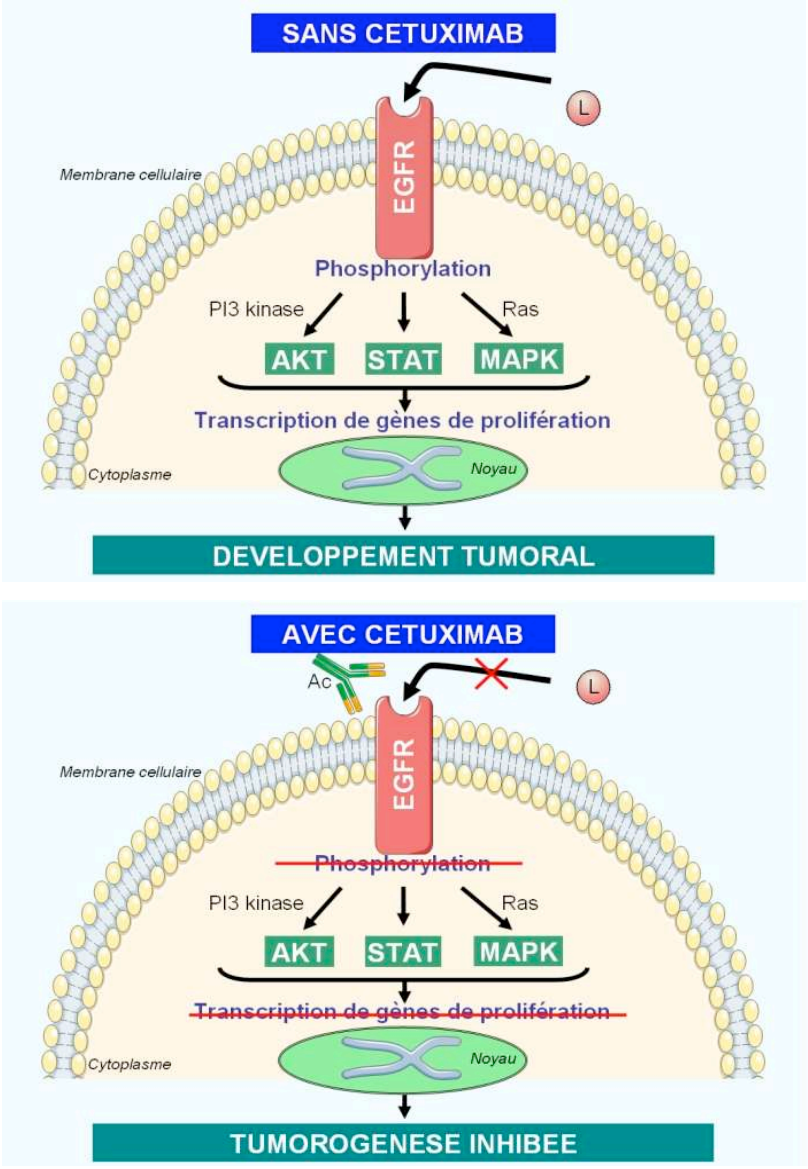


Figure 7 : Mécanisme d'action du cétuximab

Des études précliniques ont montré également que le cétuximab induisait l'internalisation, la dégradation et la régulation négative de l'expression de l'EGFR [70]. Le devenir de ce complexe suite à l'internalisation n'a pas été clairement démontré, notamment entre l'étape de dégradation et le recyclage du récepteur à la membrane plasmique.

Enfin, grâce à la région humaine (partie constante : Fc) de l'anticorps, le cétuximab recrute les cellules immunes effectrices cytotoxiques telles que les monocytes et les cellules NK (natural killer) contre les cellules tumorales (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps - ADCC) (voir Figure 8).

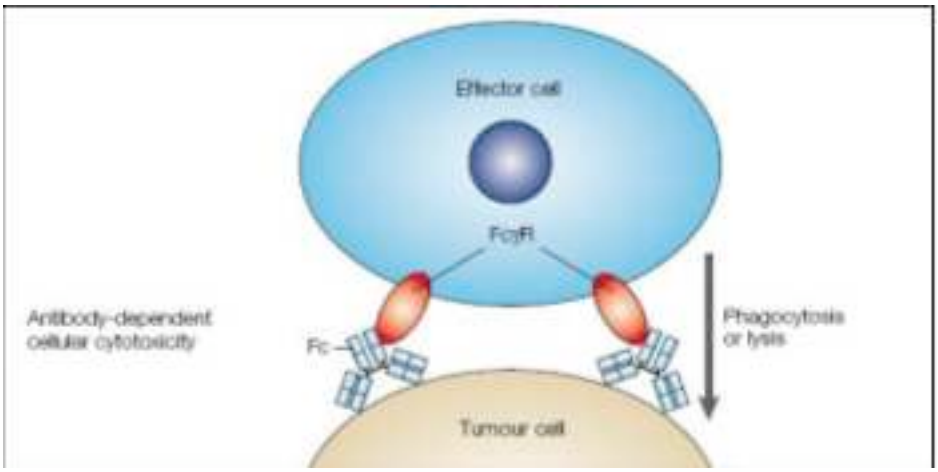


Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme de l'ADCC induite par le cétuximab[71]

2.2. Données pharmacocinétiques

Le cétuximab est administré chez l'homme par voie intraveineuse. Différentes voies pouvant contribuer au métabolisme des anticorps ont été décrites. Toutes ces voies impliquent la biodégradation de l'anticorps en molécules plus petites, c'est-à-dire en peptides de petite taille ou en acides aminés [9]. Chez l'Homme, aux doses thérapeutiques utilisées, le volume moyen de distribution était approximativement équivalent à l'espace vasculaire (2,9 litres/m2 avec un intervalle de 1,5 à 6,2 litres/m2). Chez l'Homme, le

cétuximab a une longue demi-vie d'élimination avec des valeurs comprises entre 70 et 100 heures à la dose cible. En administration intraveineuse chez la souris, les demi-vies d'élimination sont de 39,6, 37,8 et 42,2 h pour les doses de 0,04, 0,25, et 1 mg par injection [72].

2.3. Indications de l'AMM 2012

Le cétuximab est indiqué depuis juin 2004 dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec gène KRAS de type sauvage exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) [9]:

- en association avec une chimiothérapie à base d'irinotécan
- en association au FOLFOX, en première ligne métastatique
- en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine et d'irinotécan et en cas d'intolérance à l'irinotécan.

Une étude randomisée réalisée par Cunningham *et al.* en 2004 a été effectuée chez 329 patients, ayant progressé pendant ou après les trois mois d'un traitement de chimiothérapie à base d'irinotécan. Elle compare l'efficacité du cétuximab en deuxième ligne en association avec l'irinotécan, à la même posologie que celle du traitement antérieur, (218 patients) au cétuximab en monothérapie (111 patients) [14]. Le cétuximab en association avec l'irinotécan montre une activité supérieure en terme de survie sans progression (4,1 *vs.* 1,5 mois, $p<0,001$) par rapport au cétuximab utilisé seul. L'association cétuximab et irinotécan montre donc une supériorité clinique chez les patients initialement réfractaires à l'irinotécan.

Le cétuximab est aussi indiqué depuis mars 2006 dans le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou en association avec la radiothérapie en cas de maladie localement avancée et également en association avec la chimiothérapie à base de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique [9].

3. Evérolimus: inhibiteur de mTOR

3.1. Mécanisme d'action

L'evérolimus est un dérivé du sirolimus (ou rapamycine) appartenant tous les deux à la famille des inhibiteurs de la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Cette protéine est une kinase régulatrice de la voie phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) / Akt impliquée dans le métabolisme, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.

L'evérolimus forme un complexe avec la protéine FK-BP12 (FK-binding protein 12) qui se fixe au FRB (FKBP-rapamycin binding domain) localisé dans le domaine amino - terminal à proximité du site catalytique de la kinase mTOR. Le complexe evérolimus- FK-BP12 serait responsable d'un encombrement stérique entraînant l'inhibition de la protéine mTOR.

La protéine mTOR est constituée de deux sous unités: mTORC1, impliquée dans la croissance cellulaire en réponse aux stimulations des facteurs de croissance et des nutriments, et mTORC2, responsable de la prolifération et de la survie cellulaire. La protéine mTORC1 est à l'origine du déclenchement de deux voies de régulation cellulaire impliquées dans le contrôle de la traduction:

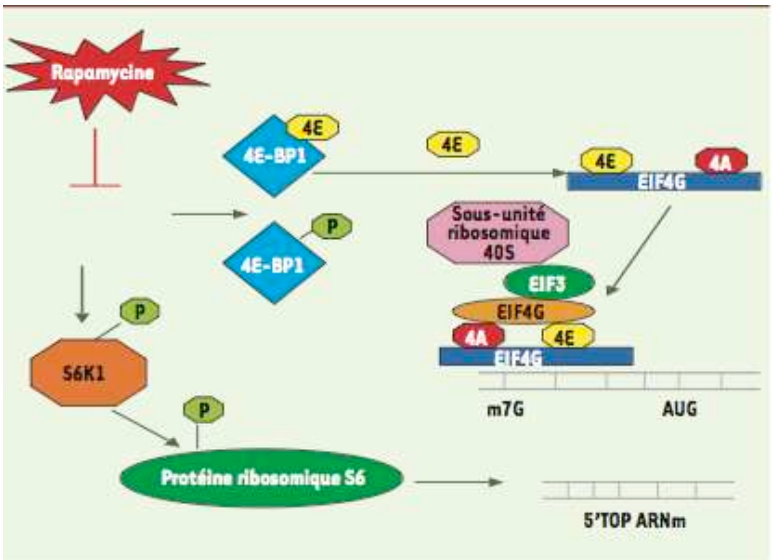


Figure 9: Inhibition de l'activité traductionnelle par les inhibiteurs de la protéine mTOR

1) mTORC1 entraîne la phosphorylation et l'activation de la kinase p70 S6 (S6 K1) permettant à son tour la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 impliquée dans la biogénèse des ribosomes.

2) mTORC1 phosphoryle également 4E-BP1 qui est un inhibiteur de la traduction. Une fois phosphorylé, 4E-BP1 se dissocie de elF4E (élongation initiator factor) qui, à son tour, peut se lier à la coiffe de certains ARNm et initialiser la traduction. Ainsi, en désactivant la kinase mTOR, l'evérolimus bloque des événements essentiels de la traduction ; ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire au stade G1 [73,74].La sous-unité mTORC2 est insensible aux inhibiteurs mTOR. Des études récentes indiquent que mTORC2 joue un rôle essentiel dans la transformation et la vitalité d'un certain nombre de types de cellules cancéreuses, mais dans beaucoup de cellules normales, son activité est moins prononcée. Ces nouvelles recherches soulèvent donc l'intérêt de développer des inhibiteurs spécifiques à la sous-unité mTORC2 [75].

3.2. Données Pharmacocinétiques

Absorption et biodisponibilité

La biodisponibilité de l'evérolimus est de 11% chez la souris [76] et de 16% chez le rat [77]. Le temps maximal d'absorption (T_{max}) est de 0,5 h chez le rat, 1h chez la souris [76,77] et 1 à 2 h chez l'Homme [9].

Distribution

L'evérolimus se lie fortement aux protéines, à 99,9% chez la souris, 92% chez le rat et 75% chez l'Homme [9,76].

Métabolisme

L'evérolimus est substrat de la P-gp, des cytochromes 3A4, 3A5, 2C8 [10,76,78,79]. Des métabolites inactifs mono- ou di-hydroxylés, déméthylés ou encore formés par

ouverture du cycle sont produits par les CYP3A4, 3A5 et 2C8 au niveau intestinal et hépatique.

Excrétion

L'évérolimus s'élimine principalement par les fécès (80%) chez l'Homme. Sa demi-vie élimination est d'environ 28 h chez l'Homme, de 20,5 h chez le rat, de 7,5 h chez la souris [9,76].

3.3. Indications de l'AMM en 2012

L'évérolimus est indiqué dans divers cancers : cancer du rein avancé depuis 2009 chez les patients ayant progressé sous ou après une thérapie ciblée anti-VEGF, tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique non resécables ou métastatiques bien ou moyennement différenciées avec progression de la maladie chez l'adulte depuis 2011 et, dernièrement, dans le cancer du sein avancé avec récepteurs hormonaux positifs, HER2/neu négatif, en association avec l'exémestane, chez les femmes ménopausées sans atteinte viscérale symptomatique dès récidive ou progression de la maladie et précédemment traitées par un inhibiteur non-stéroïdien de l'aromatase [9].

Deux études de phase I en 2008 chez les patients atteints de tumeurs solides avancées décrivent l'évérolimus comme ayant un bénéfice clinique (incluant des réponses partielles) chez des patients atteints d'un cancer colorectal [80,81]. Les recherches sur l'evérolimus en tant qu'anti-cancéreux confirme l'intérêt de nos recherches sur les propriétés anti-tumorales de l'evérolimus qui ont été débutées en mars 2008.

4. Lapatinib: inhibiteur de tyrosine-kinase de EGFR et HER2

4.1. Mécanisme d'action

Le lapatinib, une 4-anilino-quinazoline, est un inhibiteur des domaines intracellulaires de la tyrosine kinase des récepteurs EGFR (ErbB1) et ErbB2 (HER2) [82].
Le lapatinib est un inhibiteur double des deux EGFR et HER2 tyrosine kinases, inhibant la phosphorylation des récepteurs et donc les voies de signalisation en aval: voie de transduction du phosphoinositol-3-kinase (PI3-K) (impliquée dans la survie des cellules) et Ras (impliquée dans la prolifération cellulaire) (figure 10).

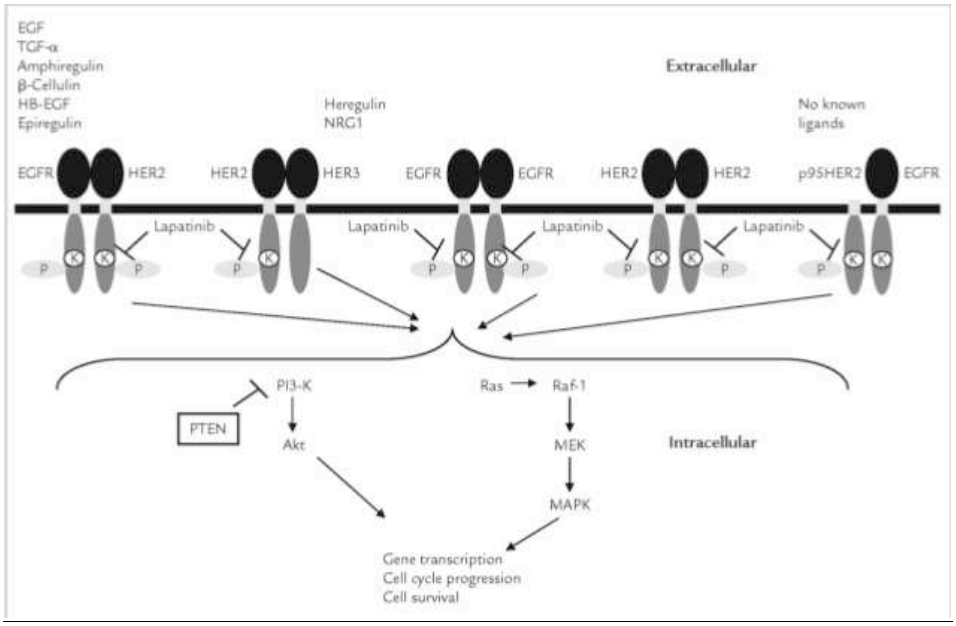


Figure 10: Mécanisme d'action du lapatinib

HB-EGF = heparin-binding EGF; PTEN = phosphatase and tensin homologue; Raf-1 = murine leukemia viral oncogène homologue 1; MEK = mitogen-activated protein kinase; MAPK = mitogen-activated protein kinase.

De plus, le lapatinib est actif contre les formes tronquées de HER2 (p95HER2). Il a été démontré qu'une surexpression des récepteurs de facteur de croissance EGFR et HER2 est

liée à une augmentation de la croissance et de la survie tumorale d'une variété de tumeurs épithéliales et, par conséquent, à un facteur de mauvais pronostic.

4.2. Données pharmacocinétiques

Absorption et biodisponibilité

Chez l'homme, l'absorption du lapatinib est incomplète et variable. L'aire sous la courbe (AUC) est d'environ 70%. L'AUC est multipliée par trois si le repas est riche en graisse [83]. La T_{max} est de 3 à 4 h [9, 82].

Distribution

Chez l'homme, le lapatinib se lie fortement aux protéines : plus de 99% à l'albumine et à l'α-1 glycoprotéine acide [9,82].

Métabolisme

Le lapatinib est fortement métabolisé, principalement par les cytochromes CYP3A4 et CYP3A5, avec une faible contribution des cytochromes CYP2C19 et CYP2C8 conduisant à la formation de nombreux métabolites oxydés, aucun d'entre eux ne représentant plus de 15% de la forme principale. Il existe un métabolite actif, le GW690006, vis-à-vis du récepteur EGFR [82]. Une étude datant de 2008 montre que le lapatinib est substrat chez la souris de la P-gp et de la BCRP au niveau de la barrière hémato-encéphalique [29]. Le lapatinib est aussi inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de la P-gp et de la BCRP chez l'homme [11,32].

Excrétion

Après atteinte de la concentration d'équilibre en 6 à 7 jours, la demi-vie d'élimination chez l'homme est de 24 h. L'excrétion se fait principalement par voie hépatique (27% de la dose orale non modifiée retrouvée dans les fécès et 2% dans les urines), suggérant une forte concentration dans les intestins [32,82]. Chez la souris, la demi-vie d'élimination est de 5,7 h.

4.1. Indications de l'AMM 2012

Le lapatinib est indiqué depuis 2008 dans le traitement du cancer du sein métastatique, avec surexpression des récepteurs HER2. Il est indiqué soit en association à la capécitabine chez les patients ayant une maladie avancée ou métastatique après un traitement ayant comporté une anthracycline, un taxane et du trastuzumab ; soit en association à un inhibiteur de l'aromatase, chez les patientes ménopausées ayant une maladie métastatique avec des récepteurs hormonaux positifs [9].

Une étude de phase I en 2009 évaluant l'association lapatinib (1250 mg) et evérolimus (5 mg) dans les cancers avancés montre que les principales toxicités observées à dose limitante étaient la diarrhée, la stomatite et la fatigue. 11 patients (2 hépatocarcinomes, 1 cancer du sein, 1 cancer du rein, 1 sarcome, 2 adénoïdes kystiques, 1 mélanome, 1 cancer de la vessie, 1 poumon à non petites cellules, 1 colorectal) ont eu une maladie stable pendant 8 semaines et plus [84]. Cette étude confirme l'intérêt de notre étude pré-clinique consistant à évaluer les propriétés anti-tumorales du lapatinib et de l'evérolimus dans le cancer colorectal que nous avons débutée en 2008.

V. Modèles murins utilisés dans nos travaux

Nous présenterons dans cette partie les modèles murins utilisés pour chaque article publié ou soumis.

1. Modèle de souris double KO mdr1a-/1b-

Ce modèle a été utilisé dans le premier article publié pour rechercher le caractère substrat de la P-gp de l'évérolimus.

A la différence de l'Homme qui ne possède qu'un seul gène P-gp, le gène mdr-1, la souris en possède deux : les gènes mdr1a et mdr1b [85]. En génie génétique, la technique, permettant l'invalidation d'un gène en remplaçant son allèle normal par un allèle mutant non fonctionnel, se nomme « Knock-out » (KO). Les souris mdr1a-/-, déficientes en P-gp, ont tout d'abord été générées chez des souris de fond génétique Fvb [86]. Des études comparatives de souris mdr1a (-/-) et mdr1b (-/-) ont montré que le gène mdr1a (-/-) est la forme principale de la P-gp murine exprimée dans les capillaires cérébraux, le tractus digestif et le placenta, tandis que le gène mdr1b (-/-) est exprimé dans le foie et les reins. L'association des deux isoformes murins semblent remplir les mêmes fonctions biologiques (spécificité des substrats et distribution de la P-gp dans les tissus) que le gène mdr-1 codant pour la P- glycoprotéine humaine [31,85].

Les souris double « KO » pour mdr1a et mdr1b constituent à l'heure actuelle le modèle de choix pour l'étude du rôle de la P-gp dans le devenir des composés substrats, médicaments ou toxiques et pour étudier les interactions médicamenteuses. Les souris obtenues sont viables, fertiles et phénotypiquement normales [31]. Puisqu'il a été montré que les protéines P-gp issues des gènes mdr1a et mdr1b ne sont pas essentielles au développement normal et à la reproduction des souris, ce résultat suggère qu'il est possible de bloquer la P-gp d'une façon chronique en clinique [85]. L'absence de P-gp chez les souris knock-out engendre une accumulation de médicaments substrats de la P-gp dans

l'organisme : en particulier dans le cerveau et dans de nombreux tissus [31,85-87]. Schellens *et al.* ont mis en évidence le caractère substrat de la P-gp du paclitaxel grâce à ce modèle, et, le rôle prépondérant de la P-gp intestinal dans l'effet de premier passage du paclitaxel. Ce résultat a permis le développement d'une stratégie thérapeutique associant un inhibiteur de la P-gp tel que la ciclosporine avec l'administration orale du paclitaxel et a été le point de départ d'essais cliniques chez l'homme [85].

Ce modèle est fourni par le Docteur Patrick Gonin de l'IFR 54 : Ressources Animales et Vétérinaires de l'Institut Gustave Roussy.

2. Modèle de xénogreffe de cancer colorectal humain chez la souris nude

Ce modèle a été utilisé dans le deuxième article qui évalue l'effacité anti-tumorale et la toxicité de l'evérolimus et du lapatinib utilisés seuls ou en schéma séquentiel.

Il a également été utilisé pour évaluer l'effet du cétuximab sur la concentration intra-tumorale de l'irinotécan et de son métabolite actif, le SN-38.

Des modèles de souris génétiquement modifiées sont actuellement disponibles pour étudier les cancers survenant dans le cadre d'une prédisposition génétique (5% des cancers), par exemple, les souris portant des mutations sur le gène de la ß-catenin pour le syndrome de Lynch, et, les souris portant des mutations sur le gène Apc pour la polypose adénomateuse familiale [88]. Cependant, il n'existe pas de modèle génétique recréant les tumeurs spontanées débutant dans les intestins et provoquant des métastases dans d'autres organes tels que le foie, les poumons, les ganglions lymphatiques, telles qu'on les retrouve chez l'homme et jouant un rôle prépondérant dans la mortalité du cancer colorectal.

Deux types de modèles de xénogreffes de cancers colorectaux humains métastasés sont actuellement disponibles : les injections de lignées de cancers humains cultivées *in vitro* et les implantations de tumeurs primaires humaines.

Le modèle de xénogreffe de cancer colorectal d'origine humaine implantée chez la souris nude SCID (severe combined immunodefiency) est un modèle de choix pour effectuer des essais pré-cliniques sur des médicaments anticancéreux [89], pour étudier leurs interactions et évaluer leur efficacité et leur tolérance.

En premier lieu, ce modèle permet d'amplifier et de maintenir stable le matériel tumoral par re-transplantation. Un résumé publié à l'ASCO en 2010 a montré que sur une totalité de 36 tumeurs humaines implantées, 39 % de transplantation réussie est observé au premier passage, puis ce taux de réussite augmente à 80 à 100% lors du deuxième et du troisième passage. Contrairement aux modèles tumoraux *in vitro* où des altérations génétiques peuvent apparaître, un avantage de ce modèle est de conserver la fonctionnalité des voies de signalisation cellulaire [90]. De plus, des multitudes de tests et de contrôles pharmacologiques et pharmacogénétiques peuvent être effectués sur la tumeur pouvant être conservée à l'état congelé. C'est un modèle représentatif de la tumeur initiale car elle conserve les caractéristiques histologiques, moléculaires et garde la même réponse à la chimiothérapie [90] et permet une corrélation avec la réponse des patients. Dans le même travail, il a été montré que les activités anti-tumorales de trois anticancéreux (le 5-FU, l'irinotécan et l'oxaliplatine) ont été traduites respectivement par une inhibition de la croissance des tumeurs de 35-48%, 57-86% et 68-89%, ce qui est une bonne corrélation avec les réponses retrouvées en clinique. Enfin, les transplantions chez la souris nude peuvent être effectuées soit en position orthotopique (situé à son emplacement anatomique habituel), soit en position sous-cutanée. La position orthotopique permet d'étudier la propagation à d'autres organes et donc l'exploration des métastases [88]. La position sous-cutanée quant à elle, offre la possibilité d'évaluer l'activité anti-tumorale des médicaments d'une manière non invasive, par mesure directe de la taille des tumeurs grâce à un pied à coulisse [88].

La patiente, chez laquelle la tumeur utilisée dans nos travaux a été prélevée, était une femme, affectée par un adénocarcinome du colon sigmoïde qui s'est propagé par des métastases ovariennes (T3N1M1). L'échantillon était issu de la tumeur primitive. La patiente a subi une colectomie, une sigmoidectomie et une excision des métastases

ovariennes. Elle a également reçu une chimiothérapie pré-opératoire à base de bévacizumab et de FOLFIRI à laquelle elle a bien répondu. Ce modèle présente une mutation KRAS. Les tests pharmacologiques sur ce modèle de xénogreffe ont montré que la tumeur était sensible au 5-FU et à l'irinotécan mais en revanche résistante au cétuximab et à l'oxaliplatine. L'échantillon de tumeur a été obtenu à partir d'une exérèse chirurgicale, puis a été coupé en morceaux de petite taille. Ces tissus ont ensuite été implantés en sous-cutané dans les flancs des souris nude SCID. Lorsque la tumeur avait atteint 2 à 3 centimètres de diamètre, elle était à nouveau prélevée pour être coupée en petits morceaux pour obtenir le modèle de deuxième génération, qui a été utilisé dans l'étude.

Nous remercions le consortium Cremec de nous avoir permis de travailler sur ce modèle de xénogreffe CR-IGR016P (« Projet C.Re.M.E.C »).

TRAVAUX PERSONNELS

Premier travail: Etude de l'influence du lapatinib sur la P-glycoprotéine: conséquence sur la pharmacocinétique, la toxicité et l'efficacité anti-tumorale de l'evérolimus

I. Objectif de l'étude

Nous avons choisi d'étudier le lapatinib et l'evérolimus dans le cancer colorectal parce que, en 2008, seules des études *in vitro* montraient d'une part que l'evérolimus était substrat de la P-gp [10] et que d'autre part le lapatinib inhibait la P-gp [11]. Notre première hypothèse était que les paramètres pharmacocinétiques de l'evérolimus pouvaient être modifiés après prétraitement par le lapatinib. Il était ensuite intéressant d'étudier l'interaction pharmacologique de deux médicaments possédant des propriétés anti-tumorales et agissant sur des cibles différentes (inhibition de la protéine mTOR ou inhibition des récepteurs tyrosine kinase) car leur association pourrait montrer une éventuelle synergie thérapeutique.

Le premier travail a comparé les pharmacocinétiques de l'evérolimus chez des souris double KO mdr1a-/1b- *versus* des souris Fvb sauvage afin de mettre en évidence le caractère substrat *in vivo* de la P-gp de l'evérolimus. L'influence d'un prétraitement de deux jours par le lapatinib sur la pharmacocinétique de l'evérolimus a ensuite été étudiée chez des souris Swiss. Des Western Blot ont également été effectués sur des intestins de souris traitées ou non par le lapatinib afin d'évaluer l'influence du lapatinib sur l'expression de la P-gp intestinale. Nous avons ensuite étudié l'effet d'un pré-traitement du lapatinib sur l'efficacité anti-tumorale et la toxicité de l'évérolimus. Leur association est étudiée dans un modèle de xénogreffe colorectale résistante à l'oxaliplatine et au cétuximab. Cette étude préclinique débutée en 2009 alors que l'evérolimus était indiqué seulement en tant qu'immunosuppresseur confirme son intérêt en tant qu'anti-cancéreux.

II. Article 1: Disposition of everolimus in mdr1a-/1b- mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice

Biochemical Pharmacology 77 (2009) 1629–1634

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Disposition of everolimus in mdr1a−/1b− mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice

C. Chu [a,*], C. Abbara [a], M.S. Noël-Hudson [b], L. Thomas-Bourgneuf [a], P. Gonin [c], R. Farinotti [b], L. Bonhomme-Faivre [a,b]

[a] Laboratory of Pharmacology, Hôpital Paul Brousse, 14 avenue Paul Vaillant Couturier 94800, Villejuif, France
[b] UPRES EA 2706 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris Sud XI, Châtenay Malabry, France
[c] Animal and Veterinary Resources, IFR 54, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 December 2008
Accepted 18 February 2009

Keywords:
Lapatinib
Everolimus
P-glycoprotein
Pharmacokinetics
Mice

ABSTRACT

The aim of this study was to document the *in vivo* transport of everolimus (inhibitor of mTOR) by P-glycoprotein (P-gp), and to investigate the influence of lapatinib (inhibitor of P-gp) on everolimus disposition.

Pharmacokinetics of everolimus (0.25 mg/kg) has been investigated after oral administration in mdr1a−/1b− mice compared to the wild type. Also, everolimus pharmacokinetics was characterized after oral administration on Swiss mice either alone or after 2 days of pre-treatment of lapatinib (200 mg/kg). The influence of lapatinib pre-treatment on intestinal P-gp expression was investigated by Western blot analysis. The non-compartimental analysis was performed using Winonlin® professional version 4.1 software (Pharsight, Mountain View, CA). The areas under the plasma concentration–time curve (AUC) were compared using Bailer's method.

A significant 1.3-fold increase of everolimus AUC observed in mdr1a−/1b− mice suggested that everolimus is transported *in vivo* by intestinal P-gp in mice. In addition, a 2.6-fold significant increase of everolimus AUC with lapatinib pre-treatment as compared with the everolimus alone group was noticed. The elimination half-life was comparable ($t_{1/2}$ = 5.3 h *vs.* $t_{1/2}$ = 4 h). A 38.5% significant decrease of P-gp expression was observed in duodenum segment in lapatinib pre-treated group as compared with control group.

In conclusion, lapatinib enhanced everolimus absorption by decreasing intestinal P-gp expression. An inhibition of CYP 450 could not be excluded. These results confirm the necessity of a therapeutic monitoring of everolimus combined with an inhibitor of the P-gp and CYP 450 like lapatinib in a future anti-tumor treatment.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Everolimus (Certican®), 40-O-(2-hydroxyethyl)−rapamycin, is a new immunosuppressant used in cardiac and renal transplantation [1,2]. This drug belongs to the family of inhibitors of the mTOR protein (mammalian target of rapamycin) which is a regulatory protein of cells metabolism, growth and proliferation. Since mTOR protein is present both in hematopoietic cells (T cells or B) and in non-hematopoietic cells (such as smooth muscle cell), everolimus will inhibits growth factors stimulated proliferation. Several studies showed the interest of everolimus as an anti-tumor agent. An increase of survival is observed in patients in post-liver transplantation neoplasms who received everolimus as compared to patients who received only an inhibitor of calcineurine (ciclosporin or tacrolimus) with steroids at 6, 12, and 24 months (100%, 90%, 72% *vs.* 50%, 29%, 14%) [3]. Everolimus anti-tumor properties could also be explained by the presence of the protein mTOR in many tumors, an inhibition of tumor growth and angiogenesis was observed in treated human tumor cells in ovarian cancer resistant cisplatine [4].

Everolimus is highly metabolized in intestine and liver. Everolimus absolute oral bioavaibility in rats is about 16% [5]. Everolimus is a substrate of P-glycoprotein (P-gp) and also of P450 3A4, 3A5 and 2C8 cytochromes [6–8]. Cytochrome P450 3A (CYP3A) and P-glycoprotein are located in enterocytes and hepatocytes. The CYP3A/P-gp system contributes to the first-pass metabolism of many drugs, resulting in a limited bioavailability [9]. Cytochrome P450 isoenzymes are parts of the Phase I metabolizing enzymes. The CYP3A subfamily is predominant and is involved in the metabolism of more than 70% of currently

* Corresponding author. Tel.: +33 1 45 59 38 38; fax: +33 1 45 59 37 16.
E-mail address: celinechu82@yahoo.fr (C. Chu).

0006-2952/$ – see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2009.02.013

Author's personal copy

administered drugs. The CYP3A represent almost 30% of the cytochromes in the liver and 70% of the cytochromes in the small intestine [10]. Many studies have demonstrated that inhibitors of cytochromes 3A are leading to an increase of AUC of drug substrates with a prolongation of half time elimination [11,12]. P-gp is part of a large family of efflux transporters which is expressed in the gonads, kidneys, biliary system, intestinal epithelium, brain capillaries and lymphocytes. P-gp is coded by the multidrug resistance MDR1 genes in humans and the mdr1a and mdr1b in mice and rats. These genes encode drug-transporting protein that can cause multidrug resistance in tumor cells by decreasing intracellular drug levels. Enhanced expression of P-gp is considered to be a major mechanism of chemotherapeutics resistance [13]. Conversely, inhibitors of P-gp may increase the oral absorption of drugs transported by P-gp. For example, verapamil enhanced bioavaibility of etoposide in rats [14]. *In vitro* study using human intestinal cell line (Caco-2) has shown that everolimus is a potent substrate for P-gp-like mediated efflux and this efflux was completely inhibited by verapamil [15]. Modifications of pharmacokinetics of drugs substrates of cytochromes or P-gp by many inhibitors of these proteins are leading to therapeutic drug monitoring. As everolimus is substrate of cytochromes and P-gp, it is conceivable that pharmacokinetics parameters of this drug could be modified after a pre-treatment by P-gp inhibitor.

Lapatinib is an inhibitor of tyrosine kinase receptors (HER 1 and HER 2) which is indicated in combination with capecitabine for the treatment of patients with advanced or metastatic breast cancer whose tumors overexpress HER 2 [16,17]. Lapatinib was chosen in this pharmacological study for several reasons. First, *in vitro* and *in vivo* studies showed that lapatinib decreases the expression of P-gp and inhibits cytochromes 3A4 and BCRP [18–20]. Thus, everolimus pharmacokinetic parameters could be modified after a lapatinib pre-treatment. Second, it is relevant to study the pharmacological interaction of these two drugs acting by two different anti-tumor mechanisms (inhibition of mTOR protein and inhibition of tyrosine kinases receptor) as they could be combined for an anti-tumor treatment. As the matter of fact, a Phase I Study evaluates the combination of lapatinib and everolimus in patients with advanced solid tumors or non-Hodgkin's lymphoma [21].

The present pharmacological study was to thus undertaken with a double purpose: (a) to document the *in vivo* effect of intestinal P-gp on everolimus disposition and (b) to investigate the effect of lapatinib pre-treatment on everolimus pharmacokinetics and its influence on intestinal P-gp expression. Therefore, we have investigated the pharmacokinetics of everolimus and digoxin (substrate test of P-gp) after oral administration in mice with naturally deficient in P-gp (mdr1a−/1b−) compared to the wild type (Fvb mice). In a second time, everolimus pharmacokinetic parameters were determined after oral administration either alone or after lapatinib pre-treatment in Swiss mice.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Digoxin (digoxine nativelle®) was purchased from Procter Gamble Pharmaceuticals (Asnières-sur-Seine, France). 100 μL of suspension (50 μg/mL) was diluted in 900 μL of sterile water to obtain a stock solution of 5 μg/mL. Everolimus (Certican®) was purchased from Novartis Pharma SAS (Rueil-Malmaison, France). The oral preparation was obtained by dispersion of a tablet (0.25 mg) in 10 mL of sterile water (0.025 mg/mL). Lapatinib (Tyverb®) was purchased from GlaxoSmith Kline (Marly-le-Roi, France). The oral preparation was obtained by dispersion of a tablet (250 mg) in 25 mL of sterile water (10 mg/mL).

2.2. Animals

Two strains of mice were used in this study. The first strain of mice was Fvb (sensitive to the B strain of friend leukemia) mice. The Fvb mice were used in digoxin and everolimus pharmacokinetic studies to document the effect of P-gp on everolimus disposition. For each drug, the wild type was compared to mdr1a−/1b− mice (mice naturally deficient of P-gp). The second strain was Swiss mice OF1. OF1 mice were used to study the influence of lapatinib pre-treatment on everolimus disposition.

All mice used in the study were female mice (20–30 g) and provided by Charles River Laboratories (Orléans, France). They were caged under standard laboratory conditions, with tap water and regular chow provided *ad libitum* in a 12 h/12 h-light/dark cycle at a temperature of 21–23 °C. Anesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane in air. The animals were treated in accordance with the European committee standards concerning the care and use of laboratory animals.

2.3. Digoxin pharmacokinetic study

Fvb and mdr1a−/1b− mice in each group orally received 0.03 mg/kg of digoxin. They were anesthetized with isoflurane and the blood samples were collected by cardiac puncture at 15, 30 min and 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 h after the administration of digoxin on heparinized tubes. The samples were centrifuged at 12,000 × *g* for 8 min and the plasma was harvested into clean tubes. For digoxin quantification, an automated method was used. Plasma digoxin concentrations were measured with fluorescent polarization assay (FPIA) on TDx® using Digoxin II® reagent kit (Abbott Diagnostic, Rungis, France). This method was linear up to 5 ng/mL with a limit of quantification at 0.2 ng/mL. All plasma samples were assayed together with calibration standard and quality control.

2.4. Everolimus pharmacokinetic study

Fvb and mdr1a−/1b− mice in each group orally received 0.25 mg/kg of everolimus. The mice were anesthetized with isoflurane and the blood samples were collected by cardiac puncture at 30 min and 1, 2, 3, 5, 8 and 24 h after the administration of everolimus on EDTA tubes. For everolimus quantification, an automated method was used. Blood everolimus concentrations were measured with fluorescent polarization assay on TDx® using INNOFLUOR®CERTICAN® kit (Biomedical diagnostics, Marne la Vallée, France). This method was linear up to 40 ng/mL with a limit of quantification at 2 ng/mL. All blood samples were assayed together with calibration standard and quality control.

2.5. Everolimus pharmacokinetic after lapatinib pre-treatment

Swiss mice were divided into two groups. The first one orally received 0.25 mg/kg of everolimus, the second one orally received 100 mg/kg of lapatinib twice a day for 2 days and 0.25 mg/kg of everolimus on the third day. The collection of everolimus blood samples and the quantification of everolimus blood concentration were done in the same conditions described for everolimus pharmacokinetic studies in Fvb and mdr1a−/1b− mice.

2.6. Data analysis. Pharmacokinetic studies

As each animal provided only one sample of blood, data from animals of the same group were pooled using a naïve averaging data approach [22]. The non-compartimental analysis was performed using Winonlin® professional version 4.1 software (Pharsight, Mountain View, CA). Data were used to estimate the

Author's personal copy

mean maximal concentration (C_{max}) and the time necessary to reach maximal concentration (T_{max}). In addition, for each treatment, the elimination rate constant (k_e) and the area under the mean concentration–time curve ($AUC_{0\rightarrow Tlast}$) were estimated. The elimination rate constant (k_e) was estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the plasma concentration *vs.* time curve, determined using unweighted linear least-squares regression analysis.

Additionally, from the estimated parameters, the terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) for each group was derived and calculated as $t_{1/2} = \ln 2/k_e$.

2.7. Semiquantitative determination of P-gp expression by Western blot analysis

P-gp expression was measured in three segments of intestine (duodenum, jejunum, and ileum) by Western blot analysis in two groups of mice: (1) 3 female Swiss mice non-pre-treated and (2) 3 female Swiss mice with a lapatinib pre-treatment. For last group, mice orally received 100 mg/kg of lapatinib twice a day for 2 days and 100 mg/kg of lapatinib on the third day. The intestines were removed 6 h after the last administration of lapatinib on the third day.

Tissues were cut into small pieces and suspended in three volumes of 0.25 M sucrose, 50 mM phosphate buffer, pH 7.20, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, and protease inhibitors: 5 μg/mL leupeptin, 0.15 mg/mL benzamidine, 5 μg/mL aprotinin, 1 μg/mL pepstatin, and 16 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The suspension was then homogenized in a glass tube. The homogenate was centrifuged at 500 × *g* for 15 min. The supernatant obtained was then centrifuged at 3000 × *g* for 15 min. The pellet was washed twice with three volumes of 0.25 M sucrose, 50 mM phosphate buffer, pH 7.20, 2 mM $MgCl_2$, and protease inhibitors and centrifuged at 3000 × *g* for 15 min. Protein concentrations were determined using the colorimetric bicinchoninic assay kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), with bovine serum albumin (BSA; Sigma–Aldrich) as a standard. Proteins (40 μg) were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Orsay, France). The nitrocellulose membranes were then incubated with a primary antibody (C219, diluted to 1:100; DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark), washed, and finally incubated with a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody. The immunoreactive bands were visualized by the enhanced Chemi-luminescent system (PerkinElmer life science, Boston, USA). The nitrocellulose membranes were also incubated with anti-β actin (dilted to 1:5000; Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) to normalize P-gp expression. The autoadiographs of P-gp and β actin proteins were scanned by densitometry using the image J software to obtain a quantitative evaluation of protein levels in the three segments of intestines.

2.8. Statistical analysis

Pharmacokinetic studies: The mean $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ estimated for each study group after administration of treatment were compared using Bailer's method [23].

The test for the equality of the mean AUC between each study group after administration of treatment was performed using the standard Wald statistic. Under the null hypothesis that mean AUCs are equal, this statistic follows a normal distribution. The null hypothesis was rejected if $|Z_{obs}|$ was greater than 1.96.

Western blot studies: In the Western blot analysis of the P-gp expression, the intensity P-gp/β actin ratio was compared using Wilcoxon's test with a significant level fixed at 0.05.

Table 1
Main pharmacokinetic parameters of digoxin after oral administration (0.03 mg/kg) obtained by a non-compartimental analysis in Fvb wild type and mdr1a−/1b− mice.

	Fvb wild type	mdr1a−/1b−
Half-life (h)	5.72	5.45
$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ (ng h/mL)	42.13	250.58
Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$[a]	5.9	
T_{max} (h)	0.25	4
C_{max} (ng/mL)	6.3	18.8
Ratio C_{max}[b]	3.0	

[a] Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ = $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ mdr1a−/1b− group/$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ wild type group.
[b] Ratio C_{max} = C_{max} mdr1a−/1b− group/C_{max} wild type group.

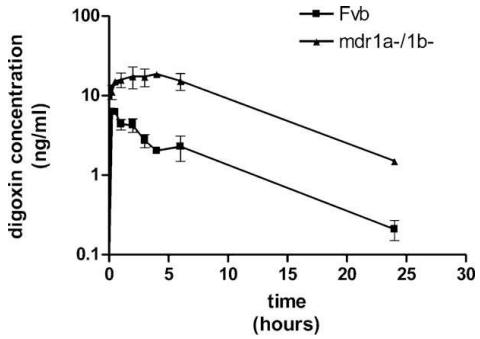


Fig. 1. Plot of time course of mean plasma digoxin concentrations (S.D.) after oral administration of digoxin at 0.03 mg/kg in Fvb and mdr1a−/1b− mice group (n = 3 per group).

3. Results

3.1. Digoxin pharmacokinetic study

The results of the non-compartimental analysis in Fvb mice group and in mdr1a−/1b− mice group after the administration of digoxin are summarized in Table 1.

As shown in Fig. 1, the oral administration of digoxin to the mdr1a−/1b− mice group resulted in a mean C_{max} 3-fold higher than the mean C_{max} in the Fvb group. Also, $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of the mdr1a−/1b− group is 5.9-fold greater than $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of the Fvb group ($p < 0.00001$, Bailer's method). The half-life of elimination was comparable (5.7 h *vs.* 5.5 h).

3.2. Everolimus pharmacokinetic study

The results of the non-compartimental analysis in Fvb mice group and mdr1a−/1b− mice group after the administration of everolimus are summarized in Table 2.

Table 2
Main pharmacokinetic parameters of everolimus after oral administration (0.25 mg/kg) obtained by a non-compartimental analysis in Fvb wild type and mdr1a−/1b− mice.

	Fvb wild type	mdr1a−/1b−
Half-life (h)	9.3	11.3
$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ (ng h/mL)	515.9	709.9
Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$[a]	1.3	
T_{max} (h)	3	3
C_{max} (ng/mL)	36.5	48.1
Ratio C_{max}[b]	1.3	

[a] Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ = $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ mdr1a−/1b− group/$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ wild type group.
[b] Ratio C_{max} = C_{max} mdr1a−1/1b− group/C_{max} wild type group.

Author's personal copy

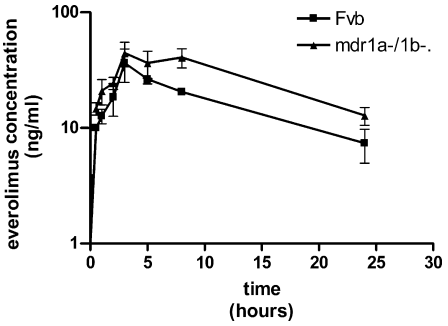


Fig. 2. Plot of time course of mean plasma everolimus concentrations (S.D.) after oral administration of everolimus at 0.25 mg/kg in Fvb and mdr1a−/1b− mice group ($n = 3$ per group).

As shown in Fig. 2, the oral administration of everolimus to the mdr1a−/1b− mice group resulted in a mean C_{max} 1.3-fold greater than the mean C_{max} in the Fvb group. Also, $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of the mdr1a−/1b− group is 1.3-fold greater than $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of the Fvb group ($p < 0.001$, Bailer's method). The half-life of elimination was comparable (9.3 h *vs.* 11.3 h).

3.3. Everolimus pharmacokinetic after lapatinib pre-treatment

The results of the non-compartimental analysis after the administration of everolimus alone and after lapatinib pre-treatment in Swiss mice are summarized in Table 3. As shown in Fig. 3, the oral administration of everolimus following a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice resulted in a mean C_{max} 1.7-fold greater than the mean C_{max} in everolimus alone group. In addition, the $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of the lapatinib pre-treated Swiss mice group is 2.6-fold greater than $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of everolimus alone group ($p < 0.001$, Bailer's method). The half-time of elimination was comparable (4.0 h *vs.* 5.3 h).

Table 3
Main pharmacokinetic parameters of everolimus (0.25 mg/kg) after oral administration (0.25 mg/kg) obtained by a non-compartimental analysis in Swiss mice.

	Everolimus	Everolimus + lapatinib
Half-life (h)	4.0	5.3
$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ (ng h/mL)	128.3	332.6
Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$[a]	2.6	
T_{max} (h)	3	3
C_{max} (ng/ml)	19.9	34.2
Ratio C_{max}[b]	1.7	

[a] Ratio $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ = $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ evero + lapa group/$AUC_{0\rightarrow Tlast}$ evero group.
[b] Ratio C_{max} = C_{max} evero + lapa group/C_{max} evero group.

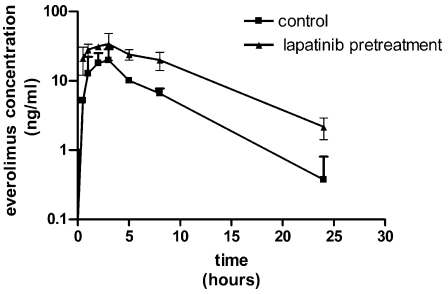


Fig. 3. Plot of time course of mean plasma everolimus concentrations (S.D.) after oral administration of everolimus at 0.25 mg/kg alone and after oral pre-treatment of lapatinib (100 mg/kg twice a day) in Swiss mice ($n = 3$ per group).

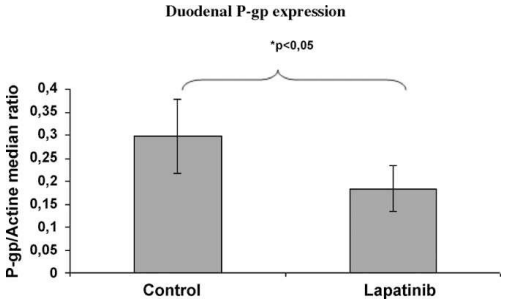


Fig. 4. Histogram of median P-gp/β actin ratio ± S.D. values from mouse duodenum ($n = 3$ per group).

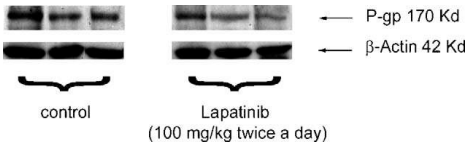


Fig. 5. P-gp immunodetection from the duodenum of mice treated with 2 days of lapatinib (100 mg/kg twice a day) or control ($n = 3$ per group).

3.4. Semiquantitative determination of P-gp expression by Western blot analysis in intestine

Western blot analysis of P-gp expression was performed on three parts of intestine (duodenum, jejunum and ileum) from three control mice and three mice pre-treated with lapatinib (100 mg/kg of lapatinib twice a day for 2 days and 100 mg/kg of lapatinib on the third day). A 38.5% significant decrease was observed in duodenum segment in lapatinib pre-treated group as compared with control group (0.298 ± 0.08 *vs.* 0.183 ± 0.05; $p < 0.05$, Wilcoxon test) (see Figs. 4 and 5). Nevertheless, in jejunum and ileum segment, no significant difference of P-gp expression was observed (0.58 ± 0.43 *vs.* 0.6 ± 0.2 and 0.47 ± 0.11 *vs.* 0.25 ± 0.68, respectively) (data not shown).

4. Discussion

The aim of this study was to document the *in vivo* effect of intestinal P-gp on everolimus disposition and to investigate the effect of lapatinib pre-treatment on everolimus pharmacokinetics and on intestinal P-gp expression.

In order to study the effect of P-gp on the disposition of everolimus, pharmacokinetics after oral administration of this drug was characterized in Fvb mice and mdr1a−/1b− mice. At the same time, the pharmacokinetics of digoxin, which is known to be a P-gp substrate [24], was realized.

The administration of the two molecules in mdr1a−/1b− mice resulted in higher C_{max} and $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ as compared to those obtained in wild type mice. The application of Bailer's method has shown that the oral bioavailability of both molecules was significantly higher in the mdr1a−/1b− group than in the wild type group. In addition, half-lives of elimination in each group appear to be comparable. All these findings, added to the results obtained previously [5,6], suggest that everolimus is transported

Author's personal copy

by intestinal P-gp in mice like digoxin. However, the ratio of $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ in everolimus group is lower than the ratio of $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ in digoxin group. Unlike digoxin, everolimus is highly metabolized by cytochromes [7,8]. Thus, intestinal cytochromes could play a role in everolimus absorption and affect its $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ after oral administration.

In order to document the influence of lapatinib on disposition of everolimus, pharmacokinetics study of this drug was carried in Swiss mice.

The first group of mice received everolimus alone (0.25 mg/kg). The second group of mice received everolimus after a lapatinib pre-treatment for 2 days (100 mg/kg, twice a day). A 2.6-fold increase of $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ of everolimus was observed in mice pre-treated by lapatinib as compared to everolimus alone. A 1.7-fold increase of everolimus C_{max} was also observed. The elimination half-lives were comparable (4.0 h *vs.* 5.3 h). *In vitro* and *in vivo* studies had shown that lapatinib is a substrate and an inhibitor of the P-gp as well as cytochromes 3A and 2C8 [18–20].

Kovarick et al. have shown that when everolimus is coadministrated with verapamil in 16 healthy subjects, 2.3-fold increase of everolimus C_{max} ((21 ± 8) ng/mL *vs.* (47 ± 18) ng/mL) was observed and accompanied by 3.5-fold increase of $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ ((115 ± 45) ng/mL h *vs.* (392 ± 142) ng/mL h). On the other hand, a slight prolongation of elimination half-life has been noticed (32 ± 6 h *vs.* 37 ± 6 h) [25]. When everolimus was coadministred with ketoconazole, a potent cytochrome 3A4 inhibitor, in 12 healthy volonteers, a 15-fold $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ increase has been observed, as compared to everolimus group alone. Also, a 1.9-fold prolongation of elimination half-life (30 ± 4 h *vs.* 56 ± 5 h) was shown [12]. Verapamil is described like an important inhibitor of P-gp and less important inhibitor of cytochrome 3A while ketoconazole is both a potent inhibitor of P-gp and cytochrome 3A. In our results, an increase of 2.6-fold everolimus $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ after a lapatinib pre-treatment was observed and accompanied with an slight prolongation of elimination half-life. Our results, when compared to those obtained in the previous study, suggest that lapatinib could have the same type of inhibition of P-gp and cytochromes as verapamil.

The determination of P-gp expression in intestines segments by Western blot analysis showed that P-gp expression decreased only in duodenum in the lapatinib pre-treated group as compared with the control group. No significant difference of P-gp expression was observed in jejunum and ileum. The concept of anatomical region-dependant modification of P-gp was already proposed to account for the inhibiting effect of some drugs on intestinal P-gp. For instance, IFN-α substantially inhibits P-glycoprotein expression in rats jejunum and ileum [26]. Quinidine increases ileal and jejunal digoxin absorption by inhibiting P-gp in rats [27]. An inhibition of duodenal P-gp expression by lapatinib could explain a decrease of the protein activity. Further investigations are needed to understand which regulators are implicated in the decrease of P-gp expression. However, it has been demonstrated that a HER 2 over expression leads to an induction of NF-κB, a transcription factor controlling expression of genes which promote cell growth and survival [28]. In addition, it has been showed that NF-κB induces P-gp expression [29]. These findings lead us to think that one of the mechanisms of the decrease of the P-gp expression by the lapatinib could be due to an inhibition of HER 2 leading to a decrease of induction of NF-κB which could result in an inhibition of P-gp expression. Other mechanism of P-gp inhibition could be implicated. *In vitro* study showed that lapatinib could directly inhibit the function of P-gp by binding to their ATP-binding sites in order to stimulate the ATPase activity for its own transport [30]. However, the increase of everolimus $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ after a lapatinib pre-treatment can not be explained by a competition of the two drugs transport by P-gp, as lapatinib last dose was administered 16 h before the administration of everolimus. Thus, it is conceivable that lapatinib decreases P-gp expression, and so, enhances everolimus $AUC_{0\rightarrow Tlast}$.

It had been demonstrated that cyclosporine inhibits the first-pass extraction of everolimus by the intestine, rather than the liver in rats. Everolimus was administered 10 min after ciclosporin administration [31]. An inhibitory effect of lapatinib on the first-pass metabolism of everolimus by cytochrome P450 in the intestine could be lead to an increase of everolimus $AUC_{0\rightarrow Tlast}$, and C_{max} without modifying the elimination half-life as noticed in our pharmacokinetic study. Nevertheless, as we discussed above, a combination of lapatinib and everolimus is necessary to evaluate a competition of the two drugs on proteins. If lapatinib was administered 16 h before the administration of everolimus, a competition of the two drugs on cytochromes P450 could not be observed. However, an inhibition of cytochromes by lapatinib in mice liver could not be excluded. In order to confirm any inhibition of cytochromes, metabolite quantification should be done. Also, *in vitro* studies showed that lapatinib inhibits BCRP transporter [19]. However, no study has documented the influence of BCRP on everolimus disposition. Thus, the results obtained from our pharmacokinetic study and from the Western blot analysis concerning everolimus and lapatinib interaction, suggest that lapatinib could enhance everolimus disposition by decreasing P-gp expression.

Administration of everolimus in Fvb mice resulted in an increase of 4.1-fold of $AUC_{0\rightarrow Tlast}$ and 1.8-fold of C_{max} higher than in Swiss mice. Obviously, absorption is enhanced, but also the elimination process appears to be different as half times of elimination are not comparable in the two strains. Many hypotheses could explain these results: physiological changes, differences in enzymatic arsenal, and protein expression according to the strains of mice.

In conclusion, this study showed first that everolimus is transported by P-gp in mice. In addition, a 2.6-fold significant increase of everolimus AUC was noticed after a lapatinib pre-treatment.

These results show the necessity of a therapeutic monitoring of everolimus when it is administered with an inhibitor of P-gp and/or cytochromes like lapatinib in an anti-tumor treatment. Moreover, it could be relevant to document the pharmacological interaction of these two drugs in combination in order to observe an eventually competition on P-gp and cytochromes and therefore, an increase of a toxicity effect. Finally, everolimus and lapatinib are two drugs with anti-tumor properties, acting on two different pathogenesis ways. Thus, lapatinib may increase the risk of toxicity associated with a higher concentration of everolimus in blood but equally the efficiency. Further investigations are necessary to document the pharmacodynamic effect of a pre-treatment of lapatinib on the anti-tumor activity of everolimus.

Acknowledgements

We acknowledge Angélique Dauvin, Mirile Ganga, Aurélie Gasnier and Benoît Petit for the excellent technical assistance and Karine Ser-Leroux for the kind help in this project.

References

[1] Ruiz JC, Sanchez A, Rengel M, Beneyto I, Plazza JJ. Use of the new proliferation signal inhibitor everolimus in renal transplant patients in Spain: preliminary results of the EVERODATA registry. Transplant Proc 2007;39(7):2157–9.
[2] Rothenburger M, Teerling E, Bruch C, Lehmkuhl H, Suwelack B, Bara C, et al. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression using everolimus (Certican) in maintenance heart transplant recipients: 6 months' follow-up. J Heart Lung Transplant 2007;26(3):250–7.
[3] Gomez-Camarero J, Salcedo M, Rincon D, Lo Iacono O, Ripoll C, Hernando A, et al. Use of everolimus as a rescue immunosuppressive therapy in liver transplant patients with neoplasms. Transplantation 2007;84(6):786–91.

Author's personal copy

[4] Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, et al. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. Clin Cancer Res 2007;13(14):4261–70.
[5] Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. Drug Metab Dispos 1999;27(5):627–32.
[6] Laplante A, Demeule M, Murphy GF, Béliveau R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial PgP. Transplant Proc 2002;34(8):3393–5.
[7] Kovarik JM, Beyer D, Schmouder RL. Everolimus drug interactions: application of a classification system for clinical decision making. Biopharm Drug Dispos 2005;27(9):421–6.
[8] Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. Clin Pharmacokinet 2004;43(2):83–95.
[9] Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. J Pharm Sci 1998;87(11):1322–30.
[10] Fakhoury M, Litalien C, Medard Y, Cavé H, Ezzahir N, Peuchmaur M, et al. Localization and mRNA expression of CYP3A and P-glycoprotein in human duodenum as a function of age. Drug Metab Dispos 2005;33(11):1603–7.
[11] Saari TI, Laine K, Bertilsson L, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Voriconazole and fluconazole increase the exposure to oral diazepam. Eur J Clin Pharmacol 2007;63(10):941–9.
[12] Kovarik JM, Beyer D, Bizot MN, Jiang Q, Shenouda M, Schmouder RL. Blood concentrations of everolimus are markedly increased by ketoconazole. J Clin Pharmacol 2005;45(5):514–8.
[13] Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(8):4028–33.
[14] Piao YJ, Li X, Choi JS. Effects of verapamil on etoposide pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2008;33(3):159–64.
[15] Crowe A, Lemaire M. *In vitro* and *in situ* absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin. Pharm Res 1998;15(11):1666–72.
[16] Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, Alligood K, Strum J, Gagnon R, et al. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. Mol Cancer Ther 2007;6(5):1629–40.
[17] Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2006;355(26):2733–43.
[18] Collins D, O'Connor R, O'Donovan N, Clynes M, Crown J. Lapatinib inhibits P-glycoprotein (P-GP) and synergistically enhances taxane cytotoxicity in PgP + cell lines. Ann Oncol 2006;17(S8):57.
[19] Polli JW, Humphreys JE, Harmon KA, Castellino S, O'Mara MJ, Olson KL, et al. The role of efflux and uptake transporters in N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5- (([2methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. Drug Metab Dispos 2008;36(4):695–701.
[20] Molina JR, Kaufmann SC, Reid J, Rubin S, Galvez-Peralta M, Friedman R, et al. Evaluation of lapatinib and topotecan combination therapy: tissue culture, murine xenograft, and phase I clinical trial data. Clin Cancer Res 2008;14(23):7900–8.
[21] http://clinicaltrials.gov/.
[22] Burtin P, Mentre F, van Bree J, Steimer JL. Sparse sampling for assessment of drug exposure in toxicological studies. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1996;21(2):105–11.
[23] Bailer AJ. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques. J Pharmacokinet Biopharm 1998;16(3):303–9.
[24] Bonhomme-Faivre L, Benyamina A, Reynaud M, Farinotti R, Abbara C. Disposition of Delta(9) tetrahydrocannabinol in CF1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. Addict Biol 2008;13:295–300.
[25] Kovarik JM, Beyer D, Bizot MN, Jiang Q, Allison MJ, Schmouder RL. Pharmacokinetic interaction between verapamil and everolimus in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol 2005;60(4):434–7.
[26] Ben-Reguiga M, Bonhomme-Faivre L, Orbach-Arbouys S, Farinotti R. Modification of the P-glycoprotein dependent pharmacokinetics of digoxin in rats by human recombinant interferon-α. Pharm Res 2005;22(11):1829–36.
[27] Su SF, Huang JD. Inhibition of the intestinal digoxin absorption and exsorption by quinidine. Drug Metab Dispos 1996;24(2):142–7.
[28] Pianetti S, Marcello A, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. Her-2/neu overexpression induces NF-κB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IκB-α that can be inhibited by the tumor expressor PTEN. Oncogene 2001;20:1287–99.
[29] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. Oncogene 2003;22(1):90–7.
[30] Dai CL, Tiwari AK, Wu CP, Su XD, Wang SR, Liu DG, et al. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. Cancer Res 2008;68:7905–14.
[31] Yokomasu A, Yano I, Sato E, Masuda S, Katsura T, Inui K. Effect of intestinal and hepatic first-pass extraction on the pharmacokinetics of everolimus in rats. Drug Metab Pharmacokinet 2008;23(6):469–75.

III. Résultats de l'article 1

1. Etude pharmacocinétique de l'evérolimus chez les souris Fvb et chez les souris mdr1a-/1b-

Les deux groupes de souris recevaient la dose de 0,25 mg/kg par voie orale. Une étude chez la souris montre que les doses utilisées de 0,25 mg/kg à 5 mg/kg étaient bien tolérées [91]. Après administration orale de l'evérolimus, une augmentation de 1,3 fois de la moyenne de la Cmax est observée chez les mdr1a-/1b- par rapport au groupe Fvb. Une augmentation de 1,3 fois de l'AUC est notée dans le groupe mdr1a-/1b- par rapport au groupe Fvb ($p<0,001$, méthode de Bailer). Les demi-vies d'élimination étaient comparables (9,3 h *vs.* 11,3 h). Nous avons bien une accumulation plasmatique de l'evérolimus chez les souris déficientes en P-gp confirmant le caractère substrat *in vivo* de la P-gp de l'evérolimus.

2. Etude pharmacocinétique de l'evérolimus seul comparée à l'evérolimus associé à un pré-traitement par le lapatinib chez des souris Swiss

Dans le groupe de souris traitées par le lapatinib, les souris recevaient la dose de lapatinib de 100 mg/kg deux fois par jour pendant deux jours. Cette posologie a été choisie à partir d'une étude d'efficacité effectuée chez la souris [92]. Puis, les deux groupes recevaient 0,25 mg/kg d'evérolimus par voie orale. Après administration orale de l'evérolimus, une augmentation de 1,7 fois de la moyenne de la Cmax est observée chez le groupe pré-traité par le lapatinib puis par l'evérolimus par rapport au groupe traité par l'evérolimus seul. L'AUC a augmenté de 2,6 fois dans le groupe pré-traité par le lapatinib ($p<0,001$, méthode de Bailer). Les demi-vies d'élimination étaient comparables (4,0 h *vs.* 5,3 h).

3. Détermination semi-quantitative de la P-gp intestinale par Western Blot

Une diminution relative de 38,5% de l'expression de la P-gp a été observée dans le duodénum dans le groupe pré-traité par le lapatinib par rapport au groupe contrôle (0,298 ± 0,08 *vs.* 0,183 ± 0,05; *p<0,05, test de Wilcoxon)* (n = 3 par groupe).

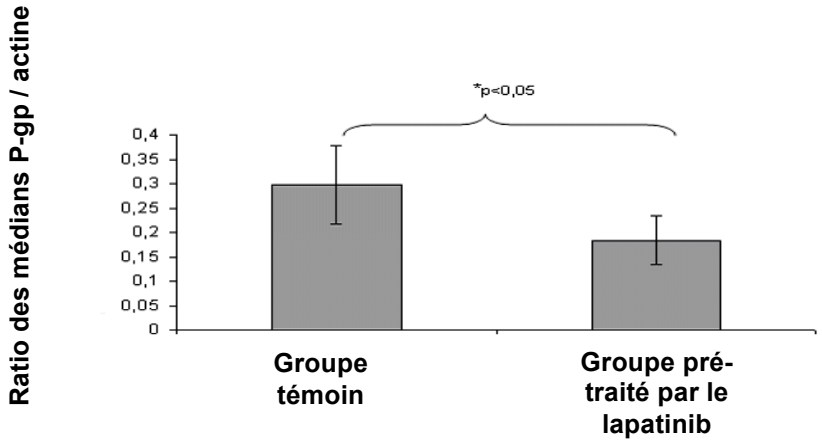


Figure 11 : Expression de la P-gp duodénale dans le groupe témoin et le groupe pré-traité par le lapatinib à la dose de 100 mg/kg deux fois par jour pendant deux jours

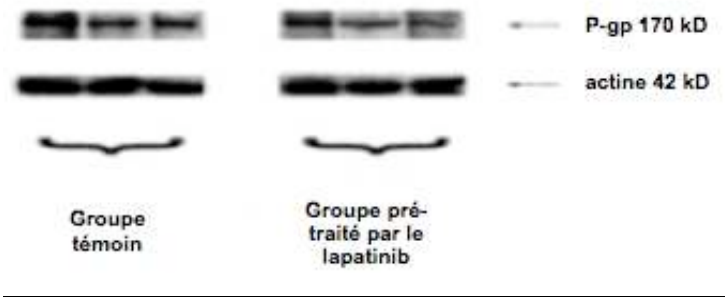


Figure 12: Western blot de la P-gp duodénale dans le groupe témoin et le groupe pré-traité par le lapatinib à la dose de 100 mg/kg deux fois par jour pendant deux jours

IV. Article 2: Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation

doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01035.x

Fundamental & Clinical Pharmacology

ORIGINAL ARTICLE

Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation

Céline Chu[a]*, Marie-Sophie Noël-Hudson[b], Valérie Boige[c], Diane Goéré[c], Sylvie Marion[d], Mélanie Polrot[e], Ludovic Bigot[f], Patrick Gonin[e], Robert Farinotti[b], Laurence Bonhomme-Faivre[a]

[a]Laboratory of Pharmacology, Hôpital Paul Brousse, 14 Avenue Paul Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France
[b]UPRES EA 4123, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France
[c]Department of Surgical Oncology, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France
[d]Laboratory of Hematology, Hôpital Paul Brousse, 14 Avenue Paul Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France
[e]Animal and Veterinary Resources, IFR 54, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France
[f]Translational Research Laboratory, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

Keywords
colorectal cancer,
everolimus,
KRAS mutation,
lapatinib,
P-glycoprotein

Received 12 September 2011;
revised 2 February 2012;
accepted 16 February 2012

*Correspondence and reprints:
celine.chu@yahoo.fr

ABSTRACT

KRAS mutation is a negative predictive prognostic factor during metastatic colorectal cancer treatment with antiepidermal growth factor receptor antibodies. For affected patients, new therapeutics must be explored. Our objective was to study efficacy of two drugs with different mechanisms of action, everolimus (mTOR inhibitor) and lapatinib (tyrosine kinase inhibitor), in a mouse xenograft model. We chose a model obtained after engraftment of a tumor originating from a human tumor collection. The patient was affected by a metastasis colorectal carcinoma resistant to cetuximab with KRAS mutation. From a previous study in mice, we know that everolimus is a P-glycoprotein (P-gp) substrate and that a lapatinib pretreatment increases significantly (2.6-fold) everolimus AUC by inhibiting its intestinal P-gp efflux. We hence tested the effect of these drugs alone or combined. Mice bearing the xenografts were divided in four groups: control, lapatinib, everolimus, and L/E group (L/E: 2 days of lapatinib 200 mg/kg and then 3 days of everolimus 1 mg/kg). Tumor volumes and treatment toxicities were evaluated. Sixteen days after treatment initiation, the group L/E was the first one in which tumor volume average was significantly lower than the one of control group (193 ± 90 vs. 395 ± 171 mm^3; $P = 0.0025$). After 4 weeks of treatment, inhibition of tumor growth in lapatinib, everolimus, and L/E groups reached, respectively, 49, 53, and 57%. Each drug showed significant antitumor activity. Only moderate hematologic toxicity signs were observed. These results lead to new perspectives for new oral drugs in metastatic KRAS-mutated colorectal cancer resistant to standard chemotherapy.

INTRODUCTION

The signaling cascade of epithelium growth factor receptor (EGFR) is now the subject of many researches toward understanding the pathways of pathogenesis and drug resistance of cancers. EGFR is expressed in all cells and overexpressed in 60–80% of colorectal cancers [1]. EGFR activation leads to the downstream stimulation of a signaling cascade including Ras/Raf-mitogen-activated protein kinase (Ras/Raf-MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene (PI3K/Akt) pathways, which are responsible for proliferation and cell survival and involved as well in angiogenesis and metastasis [2]. Therefore, the major role of EGFR in

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

colorectal cancer has led to the creation of a new class of drugs: the anti-EGFR monoclonal antibodies such as cetuximab and panitumumab. These drugs have been approved for the treatment of mCRC when used alone or in combination with irinotecan in patients with irinotecan-refractory mCRC (cetuximab) or as a single agent in patients who do not respond to available chemotherapies (panitumumab) (Available from: http://www.fda.gov/). However, in patients with KRAS-mutated protein, these drugs are inactive and are not prescribed. This mutation is responsible for downstream activation of EGFR without stimulation of the receptor and is present in 30–40% of non-responders [1]. As a consequence, in patients with advanced colorectal cancer, there is no standard therapy after tumor progression under five fluorouracil, oxaliplatin, bevacizumab and/or cetuximab and panitumumab. New therapeutic strategies must be explored (Available from: http://www.nccn.org). Everolimus (Afinitor®, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France), 40-0 – (2-hydroxyethyl) – rapamycin, is an immunosuppressant and an mTOR inhibitor, recently approved in advanced renal cell carcinoma whose disease has progressed on or after treatment with vascular endothelial growth factor (VEGF)-targeted therapy [3]. Its antitumor activity is currently studied in various tumors and hematologic malignancies [4,5]. mTOR is included in the PI3K/Akt pathway, and its signaling components have been shown to be highly activated in glandular elements of colorectal cancer and colorectal adenomas with high-grade intraepithelial neoplasia (HIN), with a correlation between staining intensity and depth of infiltration in colorectal carcinoma (CRC) [6]. Lapatinib (Tyverb®) belongs to the class of 4-anilino-quinazolines. It is a selective dual-receptor inhibitor of tyrosine kinase growth factor EGFR (or HER1 or ErbB1) and HER2 (or ErbB2), which is indicated in combination with capecitabine for the treatment of patients with advanced or metastatic breast cancer and whose tumors overexpress HER2 [7,8]. The prognostic role of HER-2 has been established in breast cancer but remains controversial in colorectal cancer [9,10]. However, increased HER2 gene copy number predicts early escape from cetuximab therapy [11]. Also, it has been showed during an *in vitro* study that KRAS-mutated non-small cell lung cancer cells are responsive to a single treatment with lapatinib but not to a single treatment with erlotinib or gefitinib, which are selective inhibitors of tyrosine kinase growth factor EGFR [12]. Because of their mechanism of action, efficacies of everolimus and lapatinib are interesting to study in a xenograft model resistant to cetuximab.

Pharmacologically, another type of resistance has been widely described as a major limitation in cancer treatment: the multidrug resistance. P-gp encoded by the MDR1 gene in humans is an efflux membrane protein playing a role in this resistance mechanism. It belongs to the family of ABC transporters. The protein acts as a pump ATPase, which can expel specific substrates through the energy provided by ATP. These substrates are either endogenous molecules of the cell such as hormones or xenobiotic substances. P-gp is expressed in the intestinal epithelium, in the biliary system, gonads, kidneys, and brain. An increase in the P-gp expression in tumors is a major limitation to a successful cancer treatment [13,14], including the treatment for colorectal cancer. Several studies showed the interest of a pretreatment by a P-gp inhibitor before administration of a P-gp substrate drug to improve its oral bioavailability (by inhibition of intestinal P-gp) or its concentration in the tumor site (by inhibition of P-gp in tumor tissue) [15]. Molina et al. [16] described that lapatinib increased topotecan accumulation in BCRP- or P-gp-expressing cells *in vitro* and that the combination showed enhanced efficacy in HER2+ BT474 xenografts. Everolimus is a substrate of P-gp and also of cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 [17–19], and lapatinib is substrate and inhibitor of P-gp, BCRP, and cytochromes [20,21].

We demonstrated in a previous study that the oral bioavailability of everolimus was increased after a pretreatment with lapatinib in mice, which we interpreted as the result of inhibition of intestinal expression of P-glycoprotein [22].

Our objective was to study the efficacy of two drugs with different mechanisms of action, namely everolimus (an mTOR inhibitor) and lapatinib (an inhibitor of tyrosine kinase), and their interaction in a xenograft model of metastasis CRC with KRAS mutation and chemotherapy resistance to cetuximab to test different means of inhibition of drug resistance in colorectal cancer.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

Everolimus (Certican®) was purchased from Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France). The oral preparation was obtained by dispersion of a tablet (1 mg) in 10 mL of sterile water (1 mg/mL). Mice received a weight-adjusted dose of everolimus (1 mg/kg). The dose

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

of everolimus was chosen according to a known antitumor effect and low enough to keep possible a synergistic effect [23]. Lapatinib, Tyverb®, was purchased from GlaxoSmith Kline (Marly-le-Roi, France). The oral preparation was obtained by dispersion of a tablet (250 mg) in 25 mL of sterile water (10 mg/mL). Mice received a weight-adjusted dose of lapatinib of 100 mg/kg, which is as previously published [22].

Animals

Female Foxn1nu CD-1 nude mice, 7 weeks old, were purchased from Animal and Veterinary Resources, Institut Gustave Roussy, IFR54 (Villejuif, France). Human CRC (CR-IGR-016P) tissue was obtained from a surgical biopsy and was cut into small pieces. These tissues were subcutaneously implanted into nude mouse flanks. When the tumor had reached 2–3 cm in diameter, it was sampled and cut into small pieces to obtain the second-passage model, which was used in the study. The mice were housed under standard laboratory sterile conditions, with sterile water and regular sterile (gamma-irradiated) chow provided *ad libitum* in a 12-h/12-h light/dark cycle at a 21–23 °C temperature. Anesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane in air. The animals were treated in accordance with the European committee standards concerning the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by Local Animal Experimentation Committee (N°26, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

Patient history

In this study was used a xenograft model originating from a human tumor collection, established under the CReMEC project: the CR-IGR016P primary xenograft. The patient, from whom the tumor originated, was a woman, with an adenocarcinoma of the sigmoid colon with ovarian metastases. The sample was directly derived from the primary tumor. The patient underwent a colectomy, sigmoidectomy, and excision of ovarian metastases. She was a good responder to a preoperative chemotherapy combination of 5-fluouracil (5-FU), irinotecan (CPT-11), and bevacizumab.

The following genetic markers, relevant in CRC, were selected for sequencing: *APC* (exons 9 and 16), *KRAS* (exons 2 and 3), *BRAF* (exons 11 and 15), *TP53* (exons 2 to 11), *CTNNB1* (exon 3), *PIK3CA* (exons 10 and 21), *FBXW7* (exons 4–11), *EGFR* (exons 18–21), and *AKT1* (exon 4). Two mutations were observed in KRAS and TP53 genes. Pharmacological tests showed that this model is very sensitive to 5-FU (++) and CPT-11 (+++) and, at the opposite, that it is resistant to cetuximab and oxaliplatin.

Evaluation of drug activity on tumor xenografts

Thirty-five mice were divided into four experimental groups and received oral treatments for 4 weeks: (i) control group ($n = 8$); (ii) group L ($n = 9$) received pretreatment of lapatinib (100 mg/kg) twice a day on Mondays and Tuesdays; (iii) group E ($n = 9$) received everolimus (1 mg/kg) once a day Wednesdays to Fridays; and (iv) group L/E ($n = 9$) received pretreatment both with lapatinib (100 mg/kg) twice a day on Mondays and Tuesdays and with everolimus (1 mg/kg) once a day Wednesdays to Fridays.

Treatment efficacy was determined by measuring tumor volumes. Animals were systematically examined every 2 days. Subcutaneous length and width of tumors were measured with a caliper. The formula used for volume calculation (V, mm^3) is as follows (assuming that tumors have an ovoid shape): '*a*' being the length and '*b*' the width in millimeters: $V = \pi^* a^* b^2/6^3$. Growth inhibition was estimated taking into account measurements on the day following the last day of treatment. Decreases in tumor volume were reported as percent inhibition, calculated as 100× [1 − (average growth of the drug-treated population/average growth of the control population)] [16].

Drug toxicity assessment

Hematologic and gastrointestinal toxicities of the treatments were evaluated. Mice weights were reported every two other days. For each mouse, blood counts and formulations (blood is collected in tubes with anticoagulant such as EDTA dipotassium) were determined on day 1 to check the homogeneity of the groups before treatment and on day 27, after the last treatment, to evaluate the potential hematologic toxicity of treatments.

Semi-quantitative determination of P-gp tumor expression by Western blot analysis

P-gp expression was measured in terminal tumor samples originating from the colorectal xenografts by Western blot analysis. The experiment was conducted twice. For each study, P-gp expression was measured in control mice ($n = 2$ for study 1; $n = 3$ for study 2), mice treated with lapatinib for 2 days (from group L) ($n = 3$ for study 1 and 2), and mice treated with everolimus (from group E) ($n = 3$ for study 1 and 2).

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

The tumors were removed after the 4-week treatment. Western Blot analyses are carried out as described in a previous article [22].

Statistical analysis

Antitumor activity

On each day, tumor volumes were compared in the four groups of mice by an ANOVA test carried out using Stat view 2.1 software (Stat View®, Abacus concept, Berkeley, CA, USA) with a significant level fixed at 0.05. If a significant difference was observed, a Student's *t*-test was performed to compare each group of mice two by two with a significant level corrected by Bonferroni's method ($P = 0.083$). Repeated-measures ANOVA test was used to compare evolution of tumor volume vs. time between each group with a significant level fixed at 0.05.

Toxicity study

Mice weights were compared between the four groups of mice by ANOVA using Stat view 2.1 with a significant level at 0.05. Leukocyte, neutrophil, lymphocyte, and platelet values were compared between the four groups of mice by ANOVA using Stat view 2.1 with a significant level at 0.05. If a significant difference was observed, a Student's *t*-test was applied to compare the groups two by two with a significance level corrected by Bonferroni's method ($P = 0.083$). As erythrocyte and hemoglobin values were significantly different between the groups on D0, we chose to perform paired t-tests to compare in each group the evolution between D0 and D27 (with a 0.05 significant level).

Western Blot analysis

The P-gp/β-actin intensity ratios were compared using the Wilcoxon's test with a significant level fixed at 0.05.

RESULTS

Antitumor activity of lapatinib alone, everolimus alone, and everolimus after lapatinib pretreatment

The evolution of tumor volumes of the four groups of mice (C: control, L: treated with lapatinib, E: treated with everolimus, L/E: pretreated with lapatinib and then treated with everolimus) is shown in *Figure 1*.

Everolimus and lapatinib have an antitumor activity on CRC xenograft. After 16 days of treatment, the group L/E was the first one for which tumor volume average was significantly lower than that of the control group (on D16, group C: 395 ± 171 vs. 193 ± 90 mm^3; $P_{L/E} = 0.0025$). On D25, the tumor average volume of the control group (714 ± 223 mm^3) was significantly higher than those of lapatinib group (364 ± 163 mm^3; $P_L = 0.0006$), everolimus group (338 ± 169 mm^3; $P_E = 0.0003$), and the lapatinib- then everolimus-treated group (305 ± 161 mm^3; $P_{L/E} < 0.0001$). The percentages of inhibition of tumor growth reached 49% for the group L, 53% for the group E, and 57% for the group L/E.

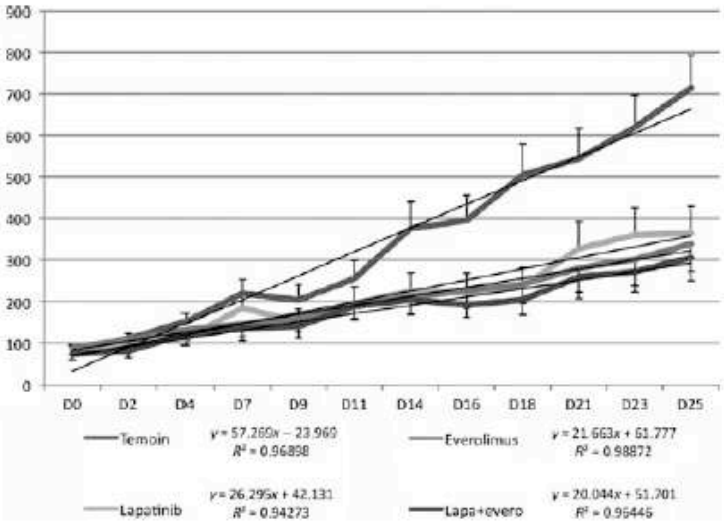


Figure 1 Evolution of tumor average volume of the colorectal carcinoma (CRC) xenograft in the four mice group (control group, $n = 8$; lapatinib, $n = 9$; everolimus, $n = 9$; lapatinib pretreatment then everolimus, $n = 9$).

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Although the tumor volume averages of the L/E group were smaller at each day of measurement after D16, no significant difference was observed between the three treated groups. Only the evolution of tumor volume in control group as time goes by is significantly different from the evolution in other groups.

Toxicity of lapatinib alone, everolimus alone, and a pretreatment of lapatinib with everolimus

Gastro-intestinal toxicity

As shown in *Figure 2*, no significant difference in body weight (daily measurement) was observed between the different groups of mice.

Hematologic toxicity

Leukocyte population. As regards the levels of leukocytes, lymphocytes, and neutrophils, mice groups were homogenous and no significant difference was observed before treatment initiation on D0 (*Table I*).

On D27, the mean leukocyte value of the control group ($2.9 \pm 0.6 \times 10^3/\mu L$) was significantly higher than that of the group L ($1.7 \pm 0.7 \times 10^3/\mu L$; $P_L = 0.0003$), group E ($2.0 \pm 0.6 \times 10^3/\mu L$; $P_E = 0.0068$), and group L/E ($2.0 \pm 0.5 \times 10^3/\mu L$; $P_{L/E} = 0.0054$).

On D27, the mean neutrophil value of the control group (1593 ± 884 µL) was significantly higher than that of the group L (720 ± 243 µL; $P_L = 0.0002$), group E (766 ± 301 µL; $P_E = 0.0006$), and group L/E (781 ± 224; µL $P_{L/E} = 0.0006$).

On D27, mean lymphocyte value of the control group (1358 ± 255 µL) was significantly higher than that of the group L (767 ± 335 µL; $P_L = 0.001$).

Red blood cells. Before administration of treatment, red blood cells values between the four mouse groups were not homogenous and significantly different ($P < 0.0001$) (*Table 2*).

It is noteworthy that in the control group, a significant increase in red blood cells level was observed between D0 and D27 (D0: $7.7 \pm 0.4 \times 10^6/\mu L$ vs. D27: $8.6 \pm 0.7 \times 10^6/\mu L$, $P = 0.0230$). However, a significant decrease was observed between D0 and D27 in the

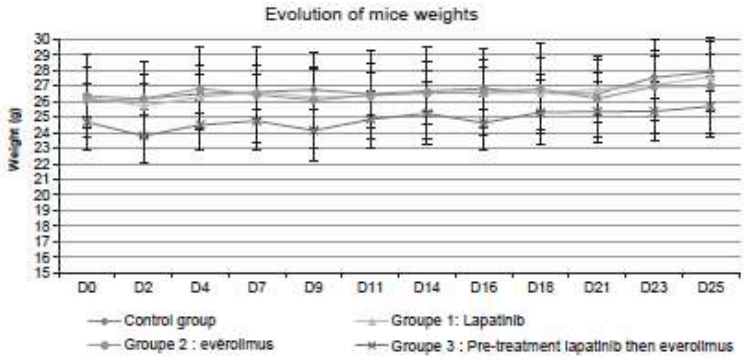


Figure 2 Gastro-intestinal toxicity evaluation Evolution of mice weights in the four mice group (control group, $n = 8$; lapatinib, $n = 9$; everolimus, $n = 9$; lapatinib pre-treatment then everolimus, $n = 9$).

Table I Leukocyte, neutrophil, and lymphocyte average values on day 0 and day 27, before and after treatment administration in the four mice groups [control group, $n = 8$; lapatinib (L), $n = 9$; everolimus (E), $n = 9$; and lapatinib pre-treatment and then everolimus (L/E), $n = 9$].

Mice group	Measurement day	Leucocyte average values ($10^3/\mu L$)	*P*	Neutrophil average values (µL)	*P*	Lymphocyte average values (µL)	*P*
Control	Day 0	4.0 ± 1.3	NS	1240 ± 162	NS	2309 ± 1067	NS
L		4.2 ± 1.1		1181 ± 379		2578 ± 849	
E		3.7 ± 0.6		1406 ± 328		1965 ± 438	
L/E		3.4 ± 0.8		1051 ± 304		2144 ± 604	
Control	Day 27	2.9 ± 0.6		1295 ± 294		1358 ± 255	
L		**1.7 ± 0.7**	0.0003*	**720 ± 243**	0.0002*	**767 ± 335**	0.001*
E		**2.0 ± 0.6**	0.0068*	**766 ± 301**	0.0006*	951 ± 368	NS
L/E		**2.0 ± 0.5**	0.0083*	**781 ± 324**	0.0006*	1036 ± 309	NS

*Values were compared to control by a Student's *t*-test and considered significant if $P < 0.083$.

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Mice group	Measurement day	Red blood cells average values (10^6/μL)	P	Haemoglobin average values (g/dL)	P
Control	Day 0	7.7 ± 0.4	0.02*	12.3 ± 1.4	0.03*
	Day 27	**8.6 ± 0.7**		**13.8 ± 0.9**	
L	Day 0	9.0 ± 0.4	0.03*	15.1 ± 0.7	0.0004*
	Day 27	**8.4 ± 0.4**		**13.4 ± 0.6**	
E	Day 0	8.3 ± 0.5	NS	12.9 ± 0.6	NS
	Day 27	8.6 ± 0.8		13.4 ± 0.9	
L/E	Day 0	8.7 ± 0.7	NS	14.6 ± 1.3	NS
	Day 27	8.9 ± 1.7		14.4 ± 2.2	

*Values between day 0 and day 27 in each group were compared by paired *t*-test and considered significant if $P < 0.05$.

Table II Red blood cells and hemoglobin average values on day 0 and day 27, before and after treatment administration in the four mice groups [control group, $n = 8$; lapatinib (L), $n = 9$; everolimus (E), $n = 9$; and lapatinib pre-treatment and then everolimus (L/E), $n = 9$].

lapatinib group (D0: $9.0 \pm 0.4 \times 10^6$/μL vs. D27: $8.4 \pm 0.4 \times 10^6$/μL, $P = 0.0262$). No significant difference was observed between the E and the L/E groups.

Before treatment, hemoglobin values across the four groups were significantly different ($P < 0.0001$). A significant increase in hemoglobin level was observed between D0 and D27 in the control group (D0: $12.3 \pm 1.4 \times 10^6$/μL vs. D27: $13.8 \pm 0.9 \times 10^6$/μL, $P = 0.0280$). As for red blood cells, a significant decrease was observed between D0 and D27 in the lapatinib group (D0: $15.1 \pm 0.7 \times 10^6$/μL vs. D27: $13.4 \pm 0.6 \times 10^6$/μL, $P = 0.0004$). No significant difference was observed between the E and the L/E groups.

Platelets population. No significant difference was observed between platelets values of mice groups before administration of treatment at D0. On D27, platelets values across the four mice groups were not significantly different (*Table III*).

Table III Average values of platelets on day 0 and day 27, before and after treatment administration in the four mice groups [control group, $n = 8$; lapatinib (L), $n = 9$; everolimus (E), $n = 9$; and lapatinib pre-treatment and then everolimus (L/E), $n = 9$].

Mice group	Measurement day	Average values of platelets (10^3/μL)	ANOVA test
Control	Day 0	809 ± 327	NS
L		1041 ± 400	
E		1001 ± 134	
L/E		885 ± 359	
Control	Day 27	923 ± 177	NS
L		1061 ± 136	
E		896 ± 194	
L/E		967 ± 489	

SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION OF P-GP EXPRESSION IN CRC XENOGRAFT BY WESTERN BLOT ANALYSIS

P-gp expression was measured from control mice ($n = 2$ for study 1; $n = 3$ for study 2), mice treated with lapatinib ($n = 3$ for studies 1 and 2), and mice treated with everolimus ($n = 3$ for studies 1 and 2). No significant difference in the P-gp/Actin ratio was observed between the three groups in each study (study 1: 0.44 ± 0.06 vs. 0.39 ± 0.15 vs. 0.43 ± 0.06, respectively; study 2: 0.51 ± 0.15 vs. 0.55 ± 0.03 vs. 0.66 ± 0.17, respectively).

DISCUSSION

The objective of this project was to evaluate the antitumor efficacy and toxicity of everolimus and lapatinib in a xenograft mouse model of metastasic CRC with KRAS mutation and chemotherapy resistance to cetuximab and oxaliplatin given separately or sequentially. After 16 days of treatment, lapatinib or everolimus, alone or in sequential administration, showed a major antitumor activity in this xenograft model (respectively: 43, 42 and 51% of growth inhibition compared to placebo group). After 4 weeks, the tumor average volume (TAV) in the control group (714 ± 223 mm^3) was significantly higher than those one in the lapatinib group (364 ± 163 mm^3; $P = 0.0006$), everolimus group (338 ± 169 mm^3; $P = 0.0003$), and L/E group (305 ± 161 mm^3; $P < 0.0001$). The percentages of inhibition of tumor growth in the lapatinib, everolimus, and L/E groups reached, respectively, 49, 53, and 57%. Mice that received everolimus after pretreatment with

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

lapatinib are the first to present a significant decrease in tumor size compared to the control group ($P = 0.0025$ after 16 days of treatment). Although these mice show the lower tumor volumes at each day of measurement, no significant difference was observed between the treated groups. It would have been interesting to continue the treatment longer to observe a decrease in tumor size and a possible increase in survival in the group treated with both drugs. Modeling of tumor and blood plasma PK suggested that in mice, multiple daily administrations result in a twofold increase in tumor levels of RAD001 at steady state [24]. Inversely, because of poor brain penetration of everolimus in rodents, the authors explained that high intermittent doses of RAD001 may be more appropriate for treatment for brain tumors and hypothesized that the increase in the tissue penetration coefficient observed at higher doses is attributable to a saturation of an efflux pump present in the brain capillary [24]. Higher doses of everolimus should be explored.

The evaluation of drug toxicities did not show significant difference in weight loss between treated groups and the control group. A sequential administration of two drugs instead of a combined administration could therefore possibly prevent an accumulation of toxicities. In an *in vivo* study carried out in mice bearing a xenograft breast cancer HER+, a significant decrease in tumor size when animals received the combination lapatinib and topotecan compared to the group that received only topotecan was observed. However, mice that received both lapatinib at 100 mg/kg and topotecan at 10 mg/kg died during the first 2 weeks of treatment. Weight losses were also significant when combining these two drugs at lower doses [16].

We evaluated drug-induced hematologic toxicity. Blood counts showed a decrease in leukocytes and neutrophils in the three treated groups. A lymphopenia was also reported in the lapatinib group compared with the control group. Anemia and leukopenia are described as frequent side effects in patients treated by everolimus at therapeutic doses. It is noteworthy that during a phase 1 trial in patients treated with lapatinib in combination with oxaliplatin, 5-fluouracile, and leucovorin, the following side effects were reported: leucopenia in 36% of patients, neutropenia in 33% of patients, and thrombocytopenia in 33% of patients [25]. At the beginning of our study (non-treated mice), red blood cell counts and hemoglobin were significantly different between the four groups of mice aged between 9 and 10 weeks. Mice blood values then stabilized after 8 and 10 weeks of age, which is the time when their growth is grossly finished [26]. The increase in red blood cells and hemoglobin levels in the control group may then be due to the normal phase of final growth in mice. At the end of treatment, red blood cells and hemoglobin level were equivalent in the control group and treated groups, which is an evidence of a moderate hematotoxicity.

In a previous study, we showed that lapatinib increased everolimus bioavailability through intestinal P-gp expression inhibition [22]. However, we failed to show a lapatinib-induced decrease in tumor P-gp expression in this study. We can hypothesize that a longer pretreatment by lapatinib might have been sufficient to induce a decrease in tumor P-gp expression and then a significant improvement in everolimus efficacy. Previously published *in vitro* studies have shown that EGF signaling pathways increase P-gp functionality by stimulating its phosphorylation [27] or activating mdr gene transcription [28,29]. The treatment of multidrug-resistant cell with EGF led to a consistent decrease in accumulation of P-gp substrates like vinblastin and rhodamin [27,29]. As a protein tyrosine kinase inhibitor blocks EGF signaling pathways, we can safely assume that lapatinib could decrease P-gp functionality through this pathway. Further investigations with these two drugs in association with different dosing regimens should be undertaken.

Currently, many studies show that it is difficult to obtain complete efficacy by addressing a single target against cancer cells. We therefore hypothesized that a combination of an inhibitor of mTOR and an inhibitor of tyrosine kinase HER 1/HER 2 would be interesting by acting on two different cellular targets. Several studies also showed that both approaches are closely linked [29,30]. It was observed that everolimus inhibits growth of cell lines resistant to inhibitors of EGFR (HER 1) and restores their ability to inhibit growth and proliferation of these cells. The EGFR inhibitors also cause a decrease in VEGF, a powerful promoter of angiogenesis. Everolimus induces a decrease in VEGF in cells resistant to EGFR inhibitors [30]. An *in vivo* study showed superiority of the antitumor efficacy of everolimus in combination with gefitinib in mice bearing colon cancer xenografts, resistant or not to gefitinib, compared to groups that received each drug alone. No toxicity related to treatment was observed in the treated groups [28]. It was also demonstrated that the serine threonine kinase p70 S6 kinase involved in protein translation and located at the crossroads of the three signaling pathways HER 1, HER-2, and mTOR is not

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

inhibited by trastuzumab, a specific inhibitor of HER 2 [30]. However, it is inhibited by lapatinib, an inhibitor of HER 1 and HER 2. Thus, rapamycin inhibits p70 S6 kinase in cells resistant to lapatinib and restores their sensitivity to lapatinib [31]. Consequently, other inhibitors of mTOR, rapamycin analogs such as everolimus, can potentiate the antitumor activity of lapatinib through this mechanism.

CONCLUSION

In conclusion, each drug alone, either lapatinib or everolimus, showed significant antitumor activity in a human colorectal metastasic carcinoma xenograft model with KRAS mutation. The mTOR inhibitor and the tyrosine kinase inhibitor should be considered in this patient population. We failed to prove that a 2-day pretreatment with lapatinib increases everolimus efficacy. However, the assessment of drug toxicities of this combination has shown moderate hematologic toxicities, which is a good point. Different dosing regimens of lapatinib and everolimus combinations should therefore be further evaluated. Finally, these results lead to new perspectives on the effectiveness of new oral drugs in metastatic colorectal cancer with KRAS mutation resistant to standard chemotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Cremec consortium that permitted the establishment of the xenograft model CR-IGR016P ('Projet C.Re.M.E.C.'). We acknowledge Dr. Vincent Castagné, Dr. Yacine Haddad and Dr. Camille Bouissou for the kind help in this project.

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1 Lamoril J., Ameziane N., Deybach J.C., Bouizegarène P., Bogard M. KRAS and colorectal cancer: an important step to the personalized medicine. IBS (2009) 24 196–209.
2 Spano J.P., Milano G., Vignot S., Khayat D. Potential predictive markers of response to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. (2008) 66 21–30.
3 Motzer R.J., Escudier B., Oudard S. et al. Efficacity of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. Lancet (2008) 372 449–456.
4 Coiffier B., Ribrag V. Exploring mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition for treatment of mantle cell lymphoma and other hematologic malignancies. Leuk. Lymphoma (2009) 81–15.
5 Yuan R., Kay A., Berg W.J., Lebwohl D.J. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. J. Hematol. Oncol. (2009) 2 45.
6 Zhang Y.J., Dai Q., Sun D.F. et al. mTOR signaling pathway is a Target for the treatment of colorectal cancer. Ann. Surg. Oncol. (2009) 16 2617–2628.
7 Geyer C.E., Forster J., Lindquist D. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N. Engl. J. Med. (2006) 355 2733–2743.
8 Hegde P.S., Rusnak D., Bertiaux M. et al. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. Mol. Cancer Ther. (2007) 6 1629–1640.
9 Essapen S., Thomas H., Green M. et al. The expression and prognostic significance of HER-2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. Int. J. Oncol. (2004) 24 241–248.
10 Kruszewski W.J., Rzepko R., Ciesielski M. et al. Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. Dis. Markers (2010) 29 207–212.
11 Finocchiaro G., Cappuzzo F., Jänne P.A. et al. EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. J. Clin. Oncol. (2007) 25 4021.
12 Kurtze I., Sonnemann J., Beck J.F. KRAS-mutated non-small cell lung cancer cells are responsive to either co-treatment with erlotinib or gefitinib and histone deacetylase inhibitors or single treatment with lapatinib. Oncol. Rep. (2011) 25 1021–1029.
13 Schinkel A.H., Mayer U., Wagenaar E. et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug – transporting) P-glycoprotein. Proc. Natl Acad. Sci. USA (1997) 94 4028–4033.
14 Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D.W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Hum. Genomics (2009) 3 281–290.
15 Hosten B., Abbara C., Petit B. et al. Effect of interleukin-2 pretreatment on paclitaxel absorption and tissue disposition after oral and intravenous administration in mice. Drug Metab. Dispos. (2008) 36 695–701.
16 Molina J.R., Kaufmann S.C., Reid J. et al. Evaluation of lapatinib and topotecan combination therapy: tissue culture, murine xenograft, and phase I clinical trial data. Clin. Cancer Res. (2008) 14 7900–7908.
17 Laplante A., Demeule M., Murphy G.F., Béliveau R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp. Transplant. Proc. (2002) 34 3393–3395.
18 Kirchner G.I., Meier-Wiedenbach I., Manns M.P. Clin pharmacokinet of everolimus. Clin. Pharmacokinet. (2004) 43 83–95.
19 Kovarik J.M., Beyer D., Bizot M.N., Jiang Q., Allison M.J., Schmouder R.L. Pharmacokinetic interaction between verapamil and everolimus in healthy subjects. Br. J. Clin. Pharmacol. (2005) 60 434–437.

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

20 Collins D., O'Connor R., O'Donovan N., Clynes M., Crown J. Lapatinib inhibits P-glycoprotein (P-GP) and synergistically enhances taxane cytotoxicity in PgP+ cell lines. Ann. Oncol. (2006) **17** 57.

21 Polli J.W., Humphreys J.E., Harmon K.A. et al. The role of efflux and uptake transporters in N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4 quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. Drug Metab. Dispos. (2008) **36** 695–701.

22 Chu C., Abbara C., Noël-Hudson M.S. et al. Disposition of everolimus in mdr1a-/1b- mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice. Biochem. Pharmacol. (2009) **77** 1629–1634.

23 O'Reilly T., McSheehy P.M. Biomarker development for the clinical activity of the mTOR inhibitor everolimus (RAD001): processes, limitations, and further proposals. Transl. Oncol. (2010) **3** 65–79.

24 O'Reilly T., McSheehy P.M., Kawai R. et al. Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. Cancer Chemother. Pharmacol. (2010) **65** 625–639.

25 Siegel-Lakhai W.S., Beijnen J.H., Vervenne W.L. et al. Phase I pharmacokinetic study of the safety and tolerability of lapatinib (GW572016) in combination with oxaliplatin/fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4) in patients with solid tumors. Clin. Cancer Res. (2007) **13** 4495–4502.

26 Green E.L. Biology of the laboratory mouse. Mc Graw Hill, New York, USA, 1966.

27 Yang J.M., Sullivan G.F., Hait W.N. Regulation of the function of P-glycoprotein by epidermal growth factor through phospholipase C. Biochem. Pharmacol. (1997) **53** 1597–1604.

28 Rohlff C., Glazer R.I. Regulation of multidrug resistance through the CAMP and EGF signalling pathways. Cell. Signal. (1995) **7** 431–443.

29 Hirsch-Ernst K.I., Ziemann C., Schmitz-Salue C., Foth H., Kahl G.F. Modulation of P-glycoprotein and mdr1b mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1995) **215** 179–185.

30 Bianco R., Garofalo S., Rosa R. et al. Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. Br. J. Cancer (2008) **98** 923–930.

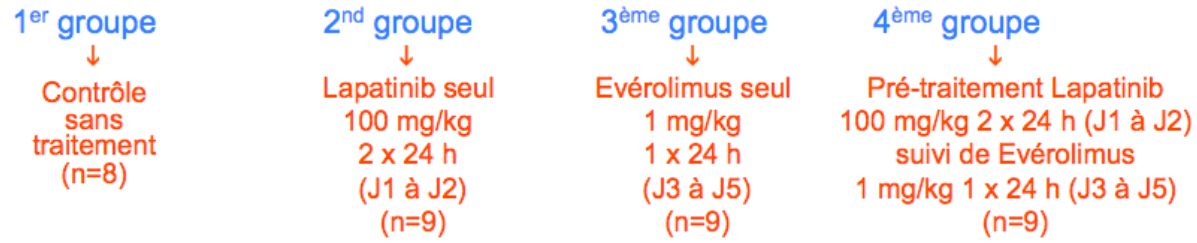
31 Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Colomer R., Brunet J., Menendez J.A. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb) in human breast carcinoma cells. Ann. Oncol. (2008) **19** 1097–1109.

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

V. Résultats de l'article 2

1. Evaluation de l'efficacité anti-tumorale du lapatinib, de l'evérolimus et de l'evérolimus après pré-traitement par le lapatinib

Les souris recevaient leur traitement selon le schéma suivant :



A J16, le groupe L/E (prétraité par le lapatinib puis traité par l'evérolimus) est le seul groupe chez lequel la moyenne des volumes tumoraux est significativement inférieure à celle du groupe témoin ($p_{L/E}$=*0,0025 <pseuil=0,0083, ANOVA, Bonferroni*). 51% d'inhibition de la croissance tumorale est observée pour le groupe L/E contre 43% pour le groupe traité par le lapatinib seul (L) et 42% pour le groupe traité par l'evérolimus seul (E). Bien que non significatif par rapport aux autres groupes traités, le pourcentage d'inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe témoin est le plus élevé pour le groupe L/E (49% pour le groupe L, 53% pour le groupe E et 57% pour le groupe L/E).

3. Evaluation de la toxicité de l'evérolimus, du lapatinib et de l'evérolimus après pré-traitement par le lapatinib

Toxicité digestive

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les 4 groupes de souris (groupe témoin et groupes traités) à chaque jour de pesée. L'état général des souris est bon dans chacun des groupes.

Toxicité hématologique

Seule une toxicité modérée est observée dans notre étude (baisse des neutrophiles, des lymphocytes, de l'hémoglobine) dans les groupes traités.

4. Détermination de l'expression de la P-gp tumorale dans la xénogreffe de cancer colorectal par analyse Western Blot

Après 4 semaines de traitement, l'expression de la P-gp ne varie pas significativement entre les 3 groupes : contrôle, lapatinib, evérolimus.

VI. Discussion du premier travail

L'objectif de ce premier travail a été de mettre en évidence l'effet *in vivo* de la P-gp intestinale sur la biodisponibilité orale de l'evérolimus, d'étudier l'effet d'un pré-traitement par le lapatinib sur les paramètres pharmacocinétiques de l'evérolimus et sur l'expression de la P-gp intestinale, puis d'évaluer l'efficacité anti-tumorale et la toxicité de l'evérolimus après un prétraitement par le lapatinib dans un modèle de xénogreffe de cancer colorectal avec mutation KRAS chez la souris.

Pour étudier l'effet de la P-gp sur la biodisponibilité orale de l'evérolimus, les pharmacocinétiques après administration orale du médicament ont été effectuées chez des souris Fvb et mdr1a-/1b-. En parallèle, les pharmacocinétiques de la digoxine, substrat test de la P-gp, ont été réalisées [93]. L'application de la méthode de Bailer montre une biodisponibilité de ces médicaments significativement supérieure chez les souris mdr1a-/1b- par rapport aux souris Fvb. Tous ces résultats, ainsi que ceux obtenus dans d'autres études [10,77], suggèrent que l'evérolimus est transporté par la P-gp intestinale chez la souris de la même manière que la digoxine.

Pour étudier l'influence d'un pré-traitement par le lapatinib sur la biodisponibilité de l'evérolimus, des études pharmacocinétiques du médicament ont été effectuées sur des souris Swiss. Une augmentation significative de 2,6 fois de l'AUC de l'evérolimus administré par voie orale a été observée chez les souris prétraitées par du lapatinib comparée à celles ayant reçues de l'evérolimus seul.

Les augmentations d'AUC de l'evérolimus sont similaires à celles du midazolam (substrat de la P-gp et des cytochromes P450) administré en association avec des inhibiteurs de la P-gp et des cytochromes P450 [94]. Les interactions ont été classées ainsi de cette manière : 1/ « forte interaction » correspond à une augmentation de plus de 5 fois l'AUC, 2/ « interaction modérée » correspond à une augmentation située entre 2 et 5, 3/ « interaction faible » correspond à une augmentation inférieure à 2 fois de l'AUC. Ainsi, selon cette classification le kétoconazole, inhibiteur puissant des CYP 450, entraîne une

forte interaction, tandis que le vérapamil, inhibiteur modéré des cytochromes P450 et de la P-gp entraîne des interactions modérées. D'après nos résultats, le lapatinib pourrait exercer le même type d'inhibition de la P-gp et des cytochromes que le vérapamil.

L'évaluation de l'expression de la P-gp dans les trois segments de l'intestin par la technique du Western Blot montre une diminution de l'expression de la P-gp uniquement dans le duodénum dans le groupe pré-traité par le lapatinib par rapport au groupe contrôle. Ainsi, une inhibition de l'expression de la P-gp du duodénum pourrait expliquer une diminution de l'activité de cette pompe d'efflux préférentiellement sur cette région anatomique.

Une étude *in vitro* publié en octobre 2008, peu avant la publication de notre premier article, montre que le lapatinib peut directement inhiber la fonction de la P-gp en se liant au site de liaison ATP afin de stimuler l'activité ATPase pour son propre transport [54]. Cependant, l'augmentation de l'AUC de l'evérolimus après un prétraitement par le lapatinib vue dans notre étude ne peut pas expliquer une compétition des deux médicaments sur la P-gp, puisque la dernière dose de lapatinib a été administrée 16 h avant l'administration de l'evérolimus. Par conséquent, il est concevable que le lapatinib diminue l'expression de la P-gp, résultat objectivé par notre analyse Western Blot, et, donc augmente l'AUC de l'evérolimus.

A la suite de nos résultats pharmacologiques, nous avons voulu étudié l'effet pharmacodynamique d'un pré-traitement par le lapatinib sur l'activité anti-tumorale et la tolérance de l'evérolimus sur un modèle de xénogreffe de cancer colorectal avec mutation KRAS donc insensible au cétuximab et également résistante à l'oxaliplatine chez la souris nude immunodéficiente.

Dans notre étude, l'évaluation de la toxicité des médicaments après 4 semaines de traitement montre qu'il n'y a pas de différence de perte de poids entre les groupes traités et le groupe contrôle. De plus, seule une toxicité hématologique modérée des traitements a été observée.

Dans une étude publiée en 2008 chez des souris porteuses d'une xénogreffe de cancer du sein HER+, une diminution significative de la taille des tumeurs est observée chez le groupe ayant reçu l'association lapatinib et topotécan (substrat de la P-gp) par rapport au groupe ayant reçu du topotécan seul. Cependant, les souris ayant reçu à la fois du lapatinib à 100 mg/kg et du topotécan à 10 mg/kg sont mortes lors des deux premières semaines de traitement. Dans cette étude, des pertes de poids importantes sont également observées lors de l'association de ces deux médicaments à des posologies plus faibles [32].

Un schéma séquentiel tel qu'il a été proposé dans notre étude entraîne une toxicité modérée des traitements.

Après quatre semaines de traitement, une diminution significative de la taille des tumeurs des groupes traités par le lapatinib, ou l'evérolimus seul, est observée par rapport au groupe contrôle. Ce résultat est important car il montre que des chimiothérapies données par voie orale telles que le lapatinib, inhibiteur de tyrosine kinase EGFR et HER2, et l'evérolimus, inhibiteur de mTOR, sont actives sur une tumeur colorectale résistante à des chimiothérapies standard telles que l'oxaliplatine, et, KRAS mutée soit résistante par un traitement par le cétuximab.

Les souris ayant reçu de l'evérolimus après pré-traitement par le lapatinib sont les premières à présenter une diminution significative de la taille de leur tumeur par rapport au groupe témoin. Bien que nous n'observions pas par la suite de différence significative entre les groupes traités, ces souris présentent à chaque jour de mesure, les volumes tumoraux les plus faibles. Il aurait été intéressant de continuer les traitements à plus long terme pour observer la dynamique de la réduction de la masse tumorale et de mesurer une éventuelle prolongation de la survie dans le groupe traité par les deux médicaments. Par ailleurs, l'analyse Western Blot montre que l'expression de la P-gp tumorale n'est modifiée ni par un traitement par l'evérolimus, ni par un traitement par le lapatinib, après 4 semaines de traitement. Ainsi, une étude d'efficacité à plus long terme associée à des dosages intra-tumoraux des médicaments avec une analyse de l'expression de la P-gp tumorale en parallèle serait intéressante.

Deuxième travail: Etude de l'influence du cétuximab sur la P-gp in vitro et in vivo : conséquence sur la pharmacocinétique de l'irinotécan

I. Objectif de l'étude

Le deuxième travail de cette thèse a eu pour objectif d'étudier le mécanisme de réversion clinique de la résistance à l'irinotécan par l'utilisation d'un anticorps monoclonal, le cétuximab.

Le cétuximab, prescrit en association avec l'irinotécan, a une efficacité clinique supérieure à celle du cétuximab utilisé en monothérapie, chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique initialement réfractaires à une première chimiothérapie à base d'irinotécan. Ce mécanisme de réversion clinique est actuellement inexpliqué.

L'hypothèse est que le cétuximab pourrait diminuer l'efflux de l'irinotécan en inhibant l'expression ou la fonctionnalité de la P-gp.

La première partie de ce travail, axée sur l'étude de l'influence du cétuximab sur la P-gp *in vitro*, a cherché à évaluer l'effet du cétuximab sur la fonctionnalité et la transcription de la P-gp. Deux lignées cellulaires surexprimant la P-gp ont été utilisées: la première, IGROV1-DXR, surexpriment la P-gp après exposition continue à la doxorubicine, et, la deuxième, HEK P-gp, stablement transfectée par la P-gp.

La deuxième partie de ce travail a eu pour objectif d'évaluer l'effet d'un traitement par le cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale de l'irinotécan et de son métabolite actif, le SN-38 chez la souris. Les pharmacocinétiques de l'irinotécan et du SN-38 ont été effectuées dans le plasma chez la souris saine, puis dans le plasma et la tumeur chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale. Puisque la P-gp est présente dans l'épithélium intestinal et les canalicules biliaires, une modification de l'activité de la protéine peut entraîner une modification de l'absorption et de l'élimination des médicaments qui en sont substrats. Par conséquent, l'irinotécan a été utilisé par voie orale dans nos travaux.

II. Effet *in vitro* du cétuximab sur la P-gp

1. Méthodologie

1.1. Modèles cellulaires

Quatre lignées ont été utilisées: les cellules IGROV1-DXR, IGROV1-PAR, HEK P-gp et HEK Mock.

Les cellules IGROV1-PAR, sensibles à la doxorubicine, proviennent d'un cancer ovarien humain de stade III [95]. La lignée IGROV1-DXR, doxo-résistante, surexprime la P-gp car elle a été dérivée de la lignée parentale par une exposition continue à la doxorubicine à des concentrations croissantes allant jusqu'à 0,1 µg/ml [95].

Les cellules HEK P-gp et Mock proviennent du tissu du rein embryonnaire humain. Les cellules HEK P-gp ont été stablement transfectées au laboratoire par le gène mdr qui leur confère une résistance à la doxorubicine. Après transfection, les cellules HEK P-gp ont été sélectionnées et maintenues dans un milieu contenant de l'hygromycine B à 50 µg/ml. Les cellules HEK Mock, sensibles à la doxorubicine, ont été stablement transfectées par un vecteur vide et maintenues dans un milieu contenant de l'hygromycine B à 50 µg/ml.

IGROV1-PAR	**HEK Mock**
• Issues d'un carcinome ovarien humain • Sensibles à la doxorubicine • Expriment faiblement la P-gp	• Issues du tissu du rein embryonnaire humain • Sensibles à la doxorubicine • N'expriment pas la P-gp
IGROV1-DXR	**HEK P-gp**
• Dérivent de la lignée parentale • Résistantes à la doxorubicine • Surexpriment la P-gp après exposition à long terme à la doxorubicine	• Issues du tissu du rein embryonnaire humain • Résistantes à la doxorubicine • Surexpriment la P-gp par transfection du gène mdr

Tableau 2 : Lignées cellulaires utilisées dans nos travaux

Nous remercions le Dr. Jean Bénard du département de Biologie et de Pathologie Médicales de l'Institut de Cancérologie Gustave Roussy de nous avoir fourni les deux lignées IGROV1-PAR et IGROV1-DXR.

1.2. Médicaments

Le cétuximab (Erbitux®) a été obtenu chez Merck Serono (Lyon, France), la doxorubicine chez Teva (La Défense, France), la vinblastine (Velbé®) chez Lilly (Suresnes, France), le vérapamil chez Abbott (Paris, France).

1.3. Choix des doses de cétuximab

Selon la FDA, les doses utilisées de cétuximab *in vitro* dans diverses études permettant d'atteindre les concentrations à l'équilibre vont de 168 à 235 µg/ml soit 1,09 à 1,53 µM [97]. Des concentrations de cétuximab allant jusqu'à 500 mg/ml (3,25 µM) ont déjà été utilisées *in vitro* [98]. Des tests MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin, France) ont été effectués afin de vérifier si les concentrations utilisées de cétuximab étaient toxiques pour les cellules [96].

1.4. Comparaison du taux d'expression de la P-gp et de l'EGFR dans les lignées IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp

Le but de cette expérience est de quantifier l'expression de la P-gp et de l'EGFR à la surface des cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp. Le principe de la méthode est d'utiliser un anticorps spécifique à la P-gp ou à l'EGFR couplé à une molécule fluorescente, la phycoérythrine (PE). La fluorescence mesurée par cytomètre de flux est proportionnelle à la quantité de P-gp ou d'EGFR exprimés à la surface des cellules.

3 jours avant l'expérience, chaque flasque T25 a été ensemencée à la densité de 5 x 10^5 cellules. Une fois décollées à l'aide d'une solution de versène, les cellules ont été réparties dans des tubes de 1,5 ml. Après lavage et centrifugation, le surnageant est retiré puis le culot est remis en suspension dans 1 ml de PBS 1X. Après comptage, les cellules sont incubées pendant 45 min à 37 °C avec un anticorps spécifique couplé à la PE soit anti-P-gp (appelé aussi UIC2, IgG 2a murin chez Abcam®, volume utilisé 5 µl qsp 100 µl PBS + 2% SVF) soit anti-EGFR (IgG 2b murin chez Pharmingen®, volume utilisé 20 µl qsp 100 µl PBS + 2% SVF). Des contrôles négatifs ont également été effectués en incubant les cellules avec des IgG non spécifiques couplées à la PE (IgG murin chez Pharmingen®, volume utilisé 20 µl qsp 100 µl PBS + 2% SVF) afin de révéler d'éventuelles fluorescences dues à des liaisons aspécifiques. Deux lavages ont ensuite été effectués avec du PBS froid. Les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux (longueur d'onde d'émission réglée à 580 nm). Chaque résultat présenté correspond à la valeur de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) obtenue après incubation avec l'anticorps spécifique. Chaque MFI est corrigée en soustrayant sa valeur à la moyenne des MFI obtenues après incubation avec l'anticorps non spécifique. L'expérience a été répétée trois fois pour chaque condition. Les moyennes des MFI ont été comparées entre les 4 lignées cellulaires par un test Mann Whitney avec un seuil de significativité p = 0,05.

1.5. Etude de la fonctionnalité de la P-gp : mesure de l'accumulation de la doxorubicine intracellulaire

Afin d'évaluer l'influence du cétuximab sur la fonctionnalité de la P-gp et donc, la conséquence sur l'accumulation intracellulaire des médicaments substrats, la doxorubicine a été utilisée comme substrat de référence de la P-gp car son dosage est possible par mesure de sa fluorescence en cytométrie de flux. Ainsi, une augmentation de l'accumulation de la doxorubicine indique donc que le cétuximab a freiné son efflux par la P-gp. A l'inverse, une diminution de l'accumulation de la doxorubicine indique que le cétuximab favorise l'efflux de la doxorubicine par la P-gp.

Selon le protocole d'incubation, il est possible de déterminer le type d'inhibition du cétuximab sur la P-gp. Nous avons établi dans cette étude deux types de protocole :

- incubation à court terme : les cellules sont incubées pendant 2 h avec le médicament testé, soit le cétuximab, à différentes concentrations (300 nM, 1 ou 3 µM) **en même temps** qu'un substrat de la P-gp, soit la doxorubicine à 10 µM dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 5% de SVF (sérum de veau fœtal) à 37°C à J4. Grâce à ce protocole, nous avons pu déterminer si le cétuximab peut exercer une **inhibition sur la fonctionnalité de la P-gp**.
- incubation à long terme : les cellules sont traitées pendant 24, 48 ou 72 h avec le médicament testé, le cétuximab, à différentes concentrations (300 nM, 1 ou 3 µM) dans un milieu DMEM contenant 10% de SVF puis sont incubées à J4 avec de la doxorubicine seule à 10 µM pendant 2 h dans un milieu DMEM contenant 5% de SVF à 37°C. Ce protocole doit permettre de déterminer si le cétuximab **influence l'activité de la P-gp via une modulation de la synthèse de la protéine ou de son ARN_m.**

Après incubation avec de la doxorubicine, les flasques sont lavées deux fois avec du tampon PBS 1x (1x phosphate-buffered saline) puis les cellules sont dissociées avec 1 ml de tampon 0,05% de Trypsin-EDTA. Les cellules sont re-suspendues dans 3 ml de milieu DMEM contenant 10% de SVF puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C. Trois lavages sont ensuite effectués pour éliminer le reste de doxorubicine extracellulaire (retrait du surnageant, lavage de cellules avec 1 ml de PBS puis centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C), la fluorescence de la doxorubicine intracellulaire est ensuite mesurée par cytométrie de flux.

Le vérapamil, inhibiteur spécifique de la P-gp, est utilisé comme témoin d'une inhibition de la P-gp, à 10 µM.

L'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) de la doxorubicine est relevée à chaque dosage intracellulaire. Chaque résultat est rendu sous forme de ratio (R) selon la formule:

$$R = 100 \times (MFI\ x - MFI\ control) / MFI\ (control)$$

« x » correspondant à un type cellulaire traité selon une condition particulière.
« control » étant le contrôle utilisé qui peut être différent selon le résultat recherché.
Chaque expérience est répétée trois fois. Des tests de Mann et Whitney ont été effectués sur les moyennes des MFI de chaque condition de chaque lignée par rapport à leur contrôle respectif avec un seuil de significativité p = 0,05.

1.6. Mesure de l'effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp par RT-PCR (reverse transcription-real time polymerase chain reaction)

Des études de RT-PCR en présence ou en absence du cétuximab ont été effectuées sur des cellules HEK P-gp et IGROV1-DXR afin d'évaluer l'effet du cétuximab sur la transcription de la P-gp.

Chaque flasque T25 a été ensemencée avec 1 x 10^6 cellules à J1. Les cellules ont été incubées pendant 24 h dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF et du cétuximab (à 300 nM et 3 µM pour les cellules HEK P-gp et 3 µM pour les cellules IGROV1-DXR). A J4, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS 1x. Le tapis cellulaire a ensuite été raclé avec 1 ml de tampon PBS contenant des inhibiteurs de protéase (1 µg/ml d'aprotinine, 1 µg/ml de leupeptine, 1 µg/ml de pepstatine et 1mM de PMSF). Les lysats ont ensuite été transférés dans des tubes propres. L'ARN total a ensuite été extrait à l'aide du kit commercial RNeasy® Plus Mini Kit (Quiagen, France). Après extraction, l'intégrité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium puis l'extrait d'ARN a été quantifié par spectroscopie d'absorbance UV à une longueur d'onde de 260 nM. Sur 2 µg de chaque extrait d'ARN a été effectué une transcription inverse à l'aide du kit Superscript II RNA reverse transcriptase (Invitrogen, Courtaboeuf, France) utilisant des amorces oligo-dT pour donner de l'ADNc. Pour l'amplication de l'ADNc par PCR, 4 µl d'une dilution de 1:50 de chaque produit de la reverse transcriptase ont été mixés avec 6 µl d'une solution contenant 0,5 µM des amorces oligonucléotidiques du gène ABCB1

(NM_000927.3): sens 5'-TGGCAAAGAAATAAAGCGAC-3' et anti-sens 5'GCATGTATGTTGGCCTCCTT-3' et du marqueur fluorescent PCR SSO Evagreen 1 x (Biorad, Marnes-la-coquette, France). L'analyse PCR en temps réel a été faite à l'aide du thermocycler CFX96 (Biorad) selon les étapes suivantes: dénaturation initiale (95°C pendant 30 s) suivie de 44 cycles de dénaturation (95°C pendant 2s), hybridation-élongation (60°C pendant 5 s). Les résultats ont été normalisés avec le taux de transcription de 3 gènes « house keeper » (GAPDH, TBP and PBOH1). Les expériences ont été répétées trois fois. Des tests de Student ont été effectués pour chaque condition avec un seuil de significativité p = 0,05.

1.7. Test d'affinité de UIC2: mise en évidence de l'interaction du cétuximab avec la P-gp dans les lignées IGROV1-DXR et HEK P-gp

Le but de cette expérience est de mettre en évidence l'interaction du cétuximab avec la P-gp dans les cellules HEK-P-gp et IGROV1-DXR à l'aide d'un anticorps spécifique à la P-gp couplé à la phycoérythrine (l'UIC2). L'affinité de l'UIC2 avec la P-gp est augmentée lorsque la P-gp est activée par des substrats ou modulateurs de la P-gp tels que la vinblastine [99-101]. L'interaction de ces substrats ou modulateurs avec la P-gp entraîne une augmentation de la fluorescence mesurée par cytomètre de flux.

A J-3, chaque flasque T25 a été ensemencée à la densité de 5 x 10^5 cellules. Après transfert des cellules dans des tubes, lavages, centrifugation et comptage, les cellules sont incubées pendant 10 min à 37 °C avec 10 µl de vinblastine 25 µM ou 10 µl de cétuximab à 1 ou 3 µM qsp 95 µl + 2% de SVF. Ensuite, 5 µl d'anticorps spécifique anti-P-gp : l'UIC2 (Abcam®) est ajouté au milieu d'incubation. Des contrôles ont été effectués en incubant les cellules soit avec de l'UIC2 seul soit avec des IgG aspécifiques couplées à la PE (contrôlé négatif). Deux lavages ont ensuite été effectués avec du PBS froid. Les mesures des MFI ont été effectuées par cytométrie de flux (longueur d'onde d'émission réglée à 580 nm). Chaque MFI est corrigée en soustrayant sa valeur à la moyenne des MFI obtenues après incubation avec l'anticorps non spécifique.

La vinblastine est un contrôle positif [99-101]. L'expérience a été répétée trois fois pour chaque condition. Les moyennes des MFI ont été comparées par un test Mann Whitney avec un seuil de significativité p = 0,05.

2. Résultats

2.1. Comparaison de l'expression de la P-gp et de l'EGFR à la surface des cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp

La mesure de la fluorescence de la phycoérythrine liée à un anticorps spécifique anti-P-gp (UIC2) confirme que l'expression de la P-gp est significativement plus importante dans les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp par rapport aux cellules IGROV1-PAR et HEK Mock. (**Figure 13**).

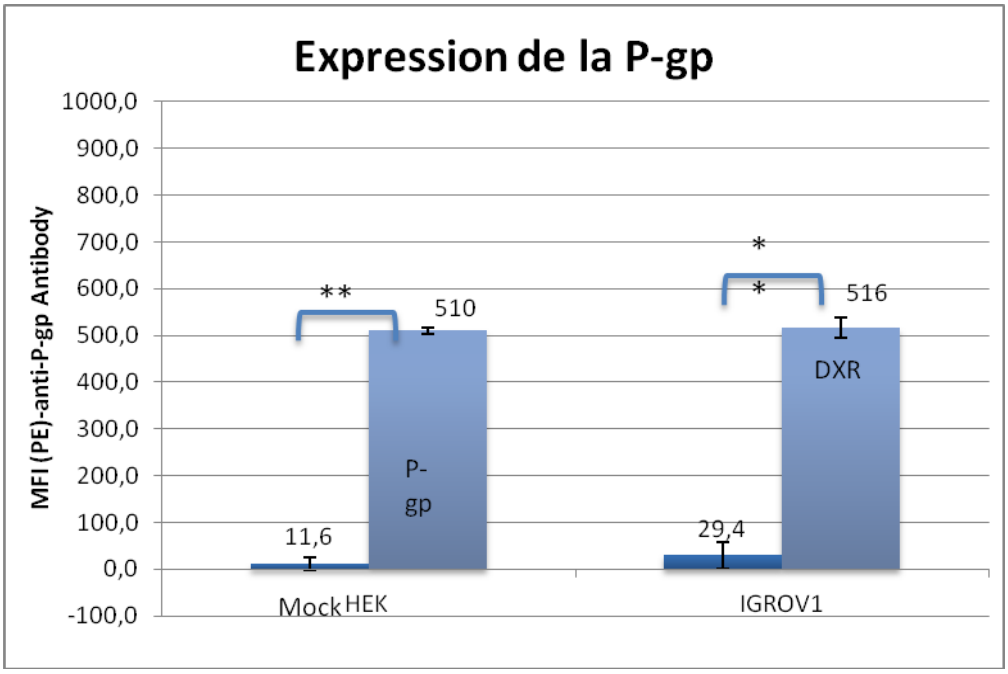


Figure 13 : Mesure de l'expression de la P-gp dans les cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp (* p<0,05; ** p<0,01)

La mesure de la fluorescence de la phycoérythrine liée à un anticorps spécifique anti-EGFR montre que l'expression de l'EGFR est significativement plus importante dans les lignées IGROV1 par rapport aux lignées HEK. De plus, le taux d'EGFR est supérieur dans les cellules HEK P-gp par rapport aux cellules HEK Mock et similaire entre les deux lignées IGROV1 (**Figure 14**).

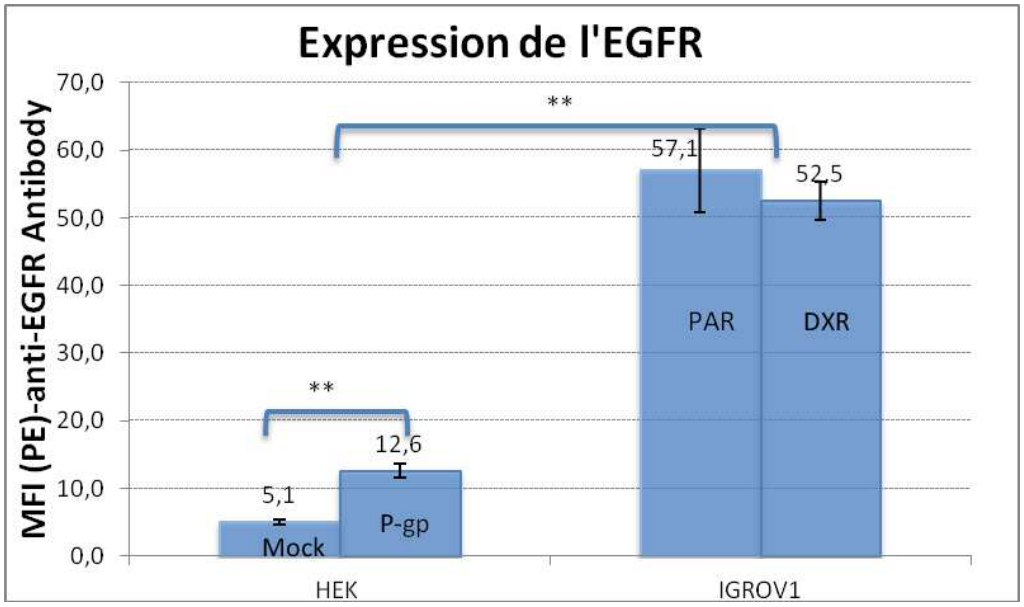


Figure 14 : Mesure de l'expression de l'EGFR dans les cellules IGROV1-PAR, IGROV1-DXR, HEK Mock et HEK P-gp (* p<0,05; ** p<0,01)

2.2. Accumulation de la doxorubicine après un traitement par le cétuximab à court terme

Après deux heures d'incubation avec de la doxorubicine 10 µM dans les quatre lignées cellulaires, l'accumulation de la doxorubicine intracellulaire est significativement supérieure dans les cellules IGROV1-PAR (exprimant faiblement la P-gp) et dans les cellules HEK Mock (n'exprimant pas la P-gp) par rapport aux cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp **(Figure 15).**

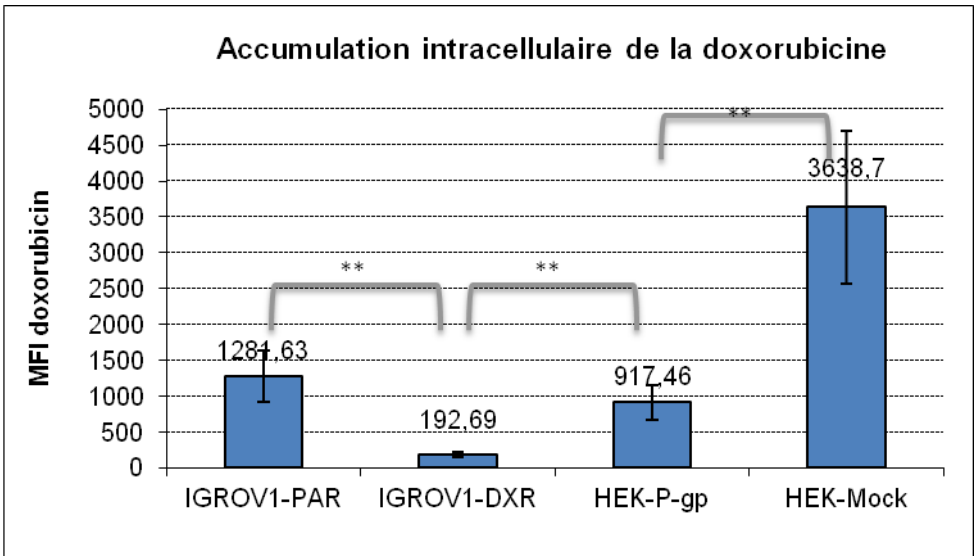


Figure 15: Augmentation de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine dans les cellules sensibles à la doxorubicine (IGROV1-PAR et HEK Mock) comparées aux cellules résistantes à la doxorubicine (IGROV1-DXR et HEK P-gp) (* p<0,05; ** p<0,01)

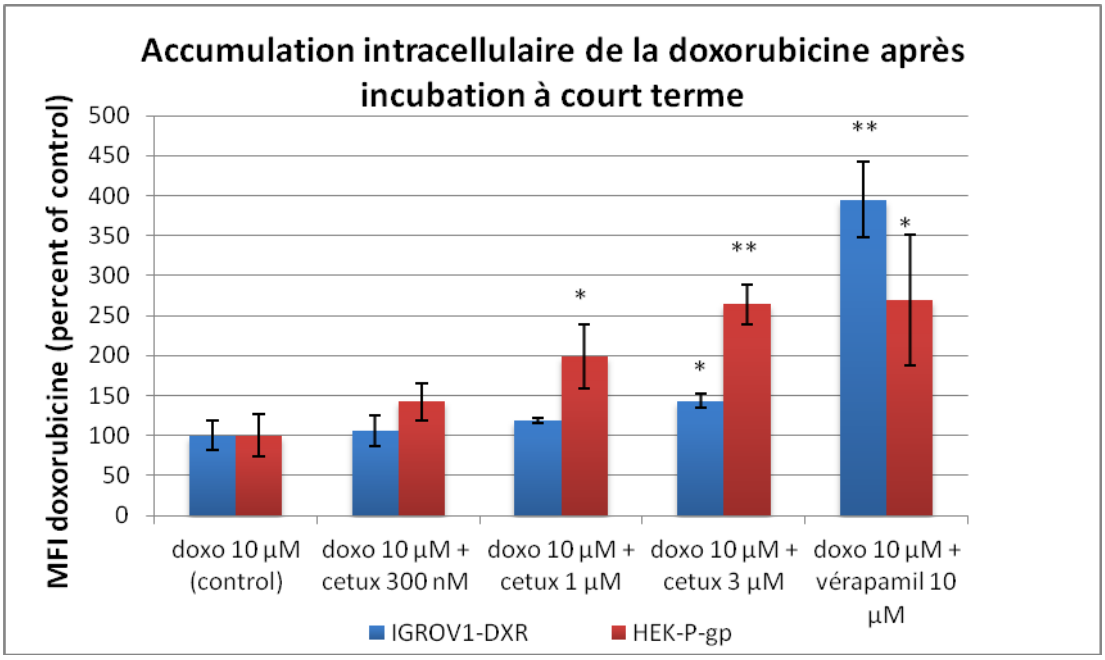
En conclusion, la doxorubicine s'accumule dans les cellules sensibles à la doxorubicine (qui expriment peu ou pas la P-gp) validant ainsi notre test. De plus, on observe que la P-gp est plus fonctionnelle dans les IGROV1-DXR par rapport aux cellules HEK P-gp.

Nous avons ensuite traité les cellules IGROV1-PAR (exprimant peu la P-gp) par le cétuximab. Aucune accumulation de la doxorubicine n'est observée dans les cellules IGROV1-PAR traitées par de la doxorubicine 10 µM et du cétuximab 3 µM par rapport aux cellules IGROV1-PAR traitées par de la doxorubicine seule (-4 ± 9 %, p = 0,41).

En conclusion, le cétuximab n'augmente donc pas l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine dans les cellules qui expriment peu la P-gp.

Nous avons ensuite traité les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp par le cétuximab à trois concentrations différentes (300 nM, 1 et 3 µM). L'accumulation significative de doxorubicine a été observée après co-incubation des cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp avec

du cétuximab à 3 µM et de la doxorubicine à 10 µM par rapport à leurs contrôles respectifs: cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp traitées par la doxorubicine 10 µM seule (**Figure 16**).



		MFI doxorubicine (percent of control)	Ratio accumulation (%)
doxo 10 µM (control)	IGROV1-DXR HEK-P-gp	100 ± 18,32 100 ± 26,49	
doxo 10 µM + cetux 300 nM	IGROV1-DXR HEK-P-gp	106,22 ± 19,33 142,03 ± 23,64	6 ± 4 84 ± 98
doxo 10 µM + cetux 1 µM	IGROV1-DXR HEK-P-gp	118,66 ± 3,77 198,74 ± 39,89	19 ± 2 148 ± 104
doxo 10 µM + cetux 3 µM	IGROV1-DXR HEK-P-gp	143,14 ± 8,66 263,95 ± 24,82	45 ± 19 238 ± 159
doxo 10 µM + vérapamil 10 µM	IGROV1-DXR HEK-P-gp	394,69 ± 47,46 269,83 ± 81,43	298 ± 34 223 ± 93

Figure 16: Augmentation de l'accumulation de la doxorubicine dans les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp co-traitées par le cétuximab à 1 et 3 µM et la doxorubicine 10 µM comparées aux cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp traitées par la doxorubicine 10 µM seule (* p<0,05; ** p<0,01)

En conclusion, le cétuximab provoque une accumulation intracellulaire de doxorubicine dans les cellules surexprimant la P-gp. De plus, chez les cellules HEK P-gp le cétuximab entraîne à la concentration de 3 µM une accumulation intracellulaire de la

doxorubicine semblable à l'action du vérapamil à 10 µM qui est un inhibiteur spécifique de la P-gp.

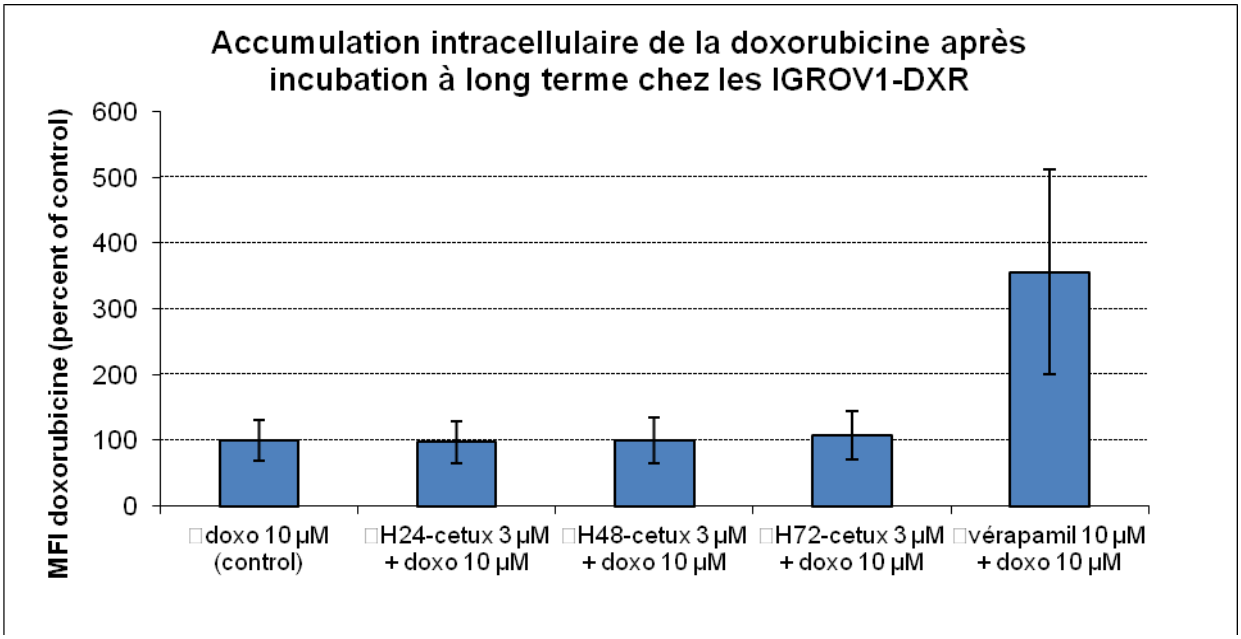
2.3. Accumulation de la doxorubicine après un prétraitement par le cétuximab à long terme

Nous avons traité les cellules IGROV1-DXR et HEK-P-gp par le cétuximab selon le protocole à long terme.

Aucune accumulation intracellulaire de la doxorubicine n'a été observée dans les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp après 24, 48 et 72 h d'incubation avec du cétuximab 3 µM suivie de 2 h d'incubation avec de la doxorubicine 10 µM comparées aux cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp traitées par de la doxorubicine 10 µM seule **(Figure 17a et 17b)**.

En conclusion, un traitement prolongé par le cétuximab n'entraîne pas d'augmentation de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine dans les cellules sur-exprimant la P-gp.

D'une façon surprenante, de légères diminutions de la doxorubicine sont observées après 24, 48 et 72h d'incubation avec du cétuximab à 300 nM et après 72h d'incubation avec du cétuximab 1 µM chez les cellules HEK P-gp **(Figure 17b)**.



	MFI doxorubicine (percent of control)	Ratio accumulation (%)
doxo 10 µM (control)	100 ± 30,47	
H24-cetux 3 µM + doxo 10 µM	97,12 ± 31,78	-3 ± 3
H48-cetux 3 µM + doxo 10 µM	100,18 ± 35,12	0,1 ± 11
H72-cetux 3 µM + doxo 10 µM	107,94 ± 37,01	7 ± 4
vérapamil 10 µM + doxo 10 µM	355,92 ± 156,08	244 ± 73

Figure 17a : Absence d'accumulation de la doxorubicine dans les cellules IGROV1-DXR après 24, 48 et 72 h d'incubation avec du cétuximab à 3 µM suivie de 2 h d'incubation avec de la doxorubicine 10 µM à J4 (* p<0,05; ** p<0,01)

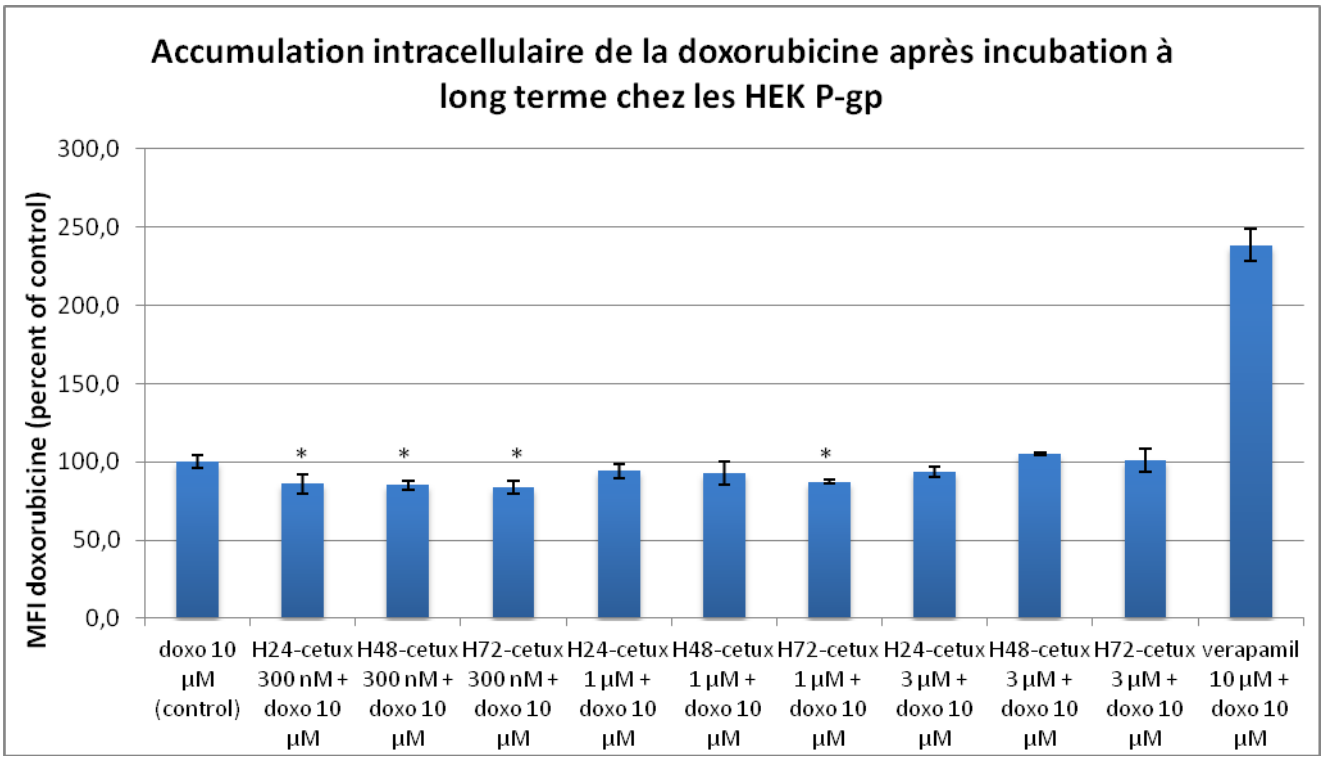


Figure 17b : Légère induction de la P-gp dans les cellules HEK P-gp après 24 h d'incubation avec le cétuximab à 300 nM, 1 et 3 µM suivie de 2 h d'incubation avec la doxorubicin 10 µM à J4 (* p<0,05; ** p<0,01)

	MFI doxorubicine (percent of control)	Ratio accumulation (%)
doxo 10 µM (control)	100 ± 4,2	
H24-cetux 300 nM + doxo 10 µM	85,9 ± 6,4	-14 ± 3
H48-cetux 300 nM + doxo 10 µM	85 ± 2,9	-15 ± 1
H72-cetux 300 nM + doxo 10 µM	83,8 ± 4,0	-16 ± 6
H24-cetux 1 µM + doxo 10 µM	94,2 ± 4,3	-3 ± 4
H48-cetux 1 µM + doxo 10 µM	92,6 ± 7,4	-7 ± 10
H72-cetux 1 µM + doxo 10 µM	87,3 ± 1,2	-13 ± 4
H24-cetux 3 µM + doxo 10 µM	93,6 ± 3,4	-6 ± 2
H48-cetux 3 µM + doxo 10 µM	105,2 ± 1,1	5 ± 4
H72-cetux 3 µM + doxo 10 µM	101 ± 7,5	1 ± 7
verapamil 10 µM + doxo 10 µM	238,57 ± 10,04	139 ± 20

NB: Les trois concentrations de cétuximab (300 nM, 1 et 3 µM) ont été testées chez les HEK P-gp où une accumulation plus importante de doxorubicine était observée dans le protocole d'incubation à court terme.

2.4. Effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp

Aucune variation significative du taux d'ARN de la P-gp n'a été observée après traitement par le cétuximab à 3 µM dans les cellules IGROV1-DXR **(Figure 18a)**.

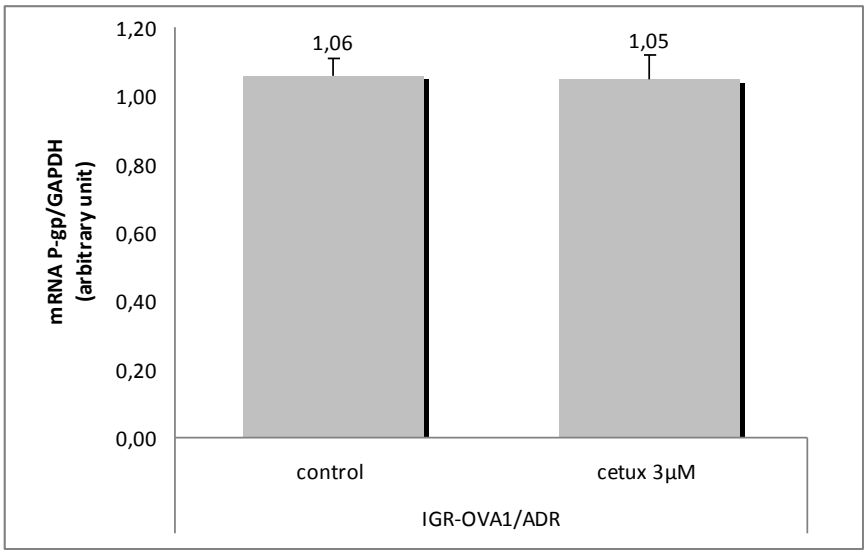


Figure 18a: Absence d'effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp dans les cellules IGROV1-DXR après 24 h d'incubation avec du cétuximab à 3 µM

Aucune variation significative du taux d'ARN de la P-gp n'a été observée après traitement par le cétuximab à 300 nM et 3 µM dans les cellules HEK P-gp **(Figure 18b)**.

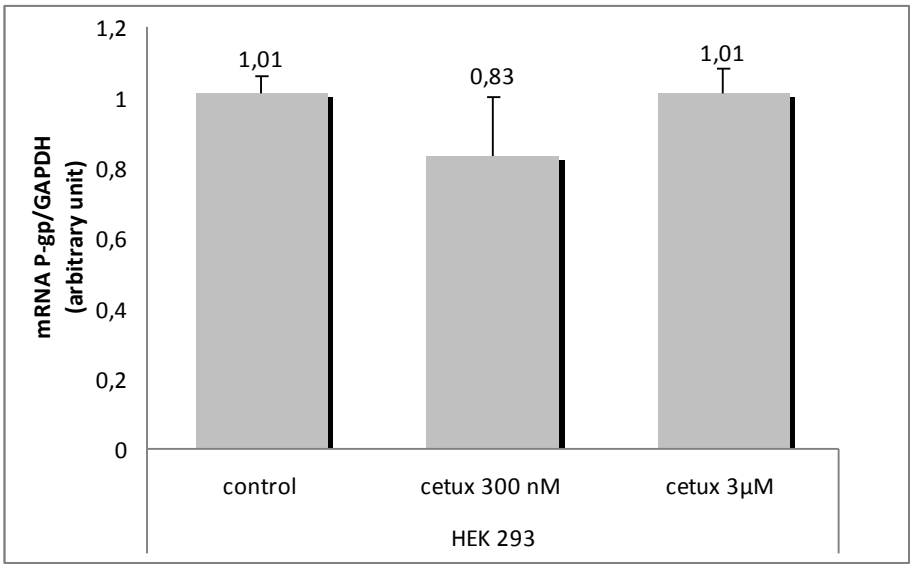


Figure 18b: Absence d'effet du cétuximab sur l'ARN de la P-gp dans les cellules HEK P-gp après 24 h d'incubation avec du cétuximab à 300 nM et 3 µM

2.5. Test d'affinité de l'UIC2

La vinblastine et le cétuximab augmentent significativement l'affinité de l'UIC2 à la P-gp dans les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp ce qui indique qu'ils interagissent directement avec la P-gp.

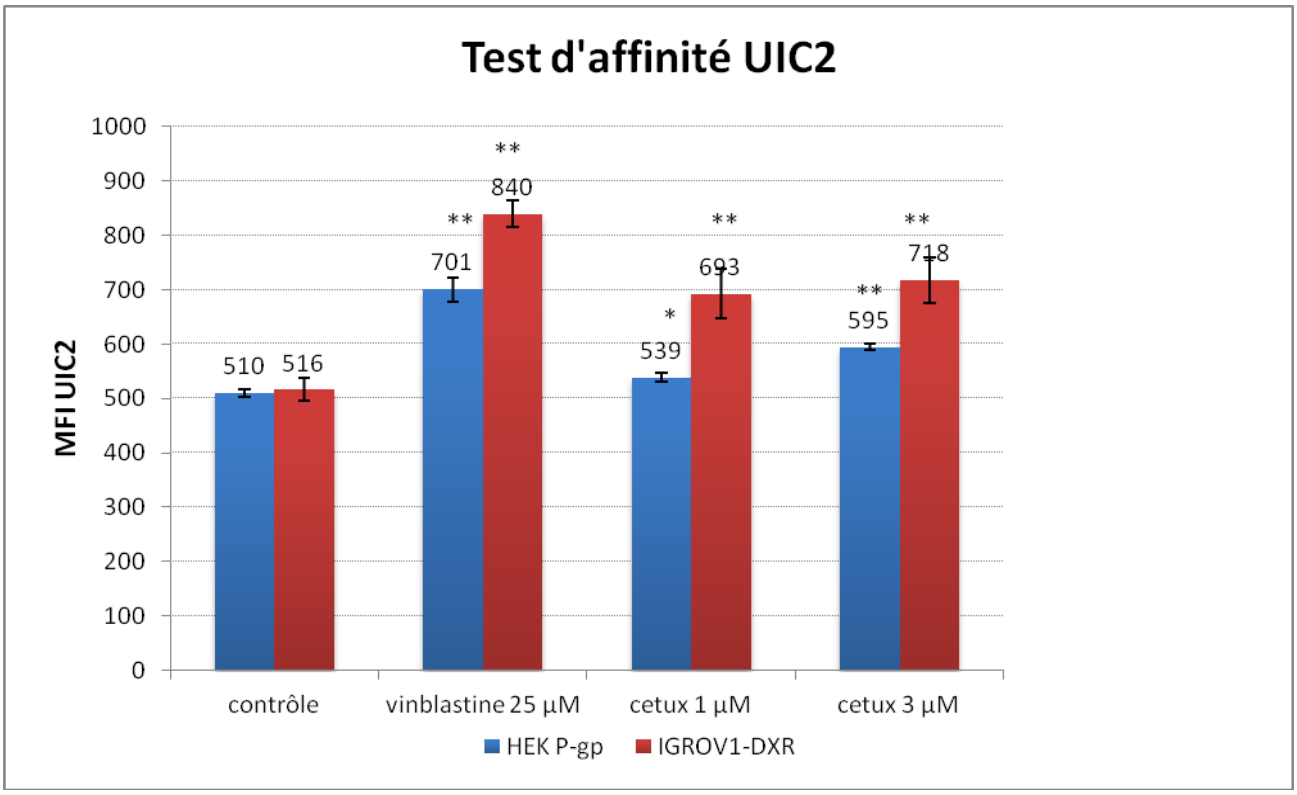


Figure 19: Effet du cétuximab sut l'affinité de l'UIC2 à la P-gp (* p<0,05; ** p<0,01)

III. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique de l'irinotécan chez la souris nude saine

Article 3 : Cetuximab pretreatment with oral irinotecan prolongs its remaining plasma concentration in mice.

C Chu[a,b], C Abbara[a], M Polrot[c], P Gonin[c], R Farinotti[b], L Bonhomme-Faivre[a,b]

[a]Laboratory of Pharmacology, Service Pharmacie, Hôpital Paul Brousse AP-HP, 14 avenue Paul Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France ;

[b]UPRES EA 4123 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris Sud XI, 5, rue Jean-Baptiste Clément 92296 Châtenay-Malabry cedex, France ;

[c]Animal and Veterinary Resources, IFR 54, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France.

Correspondance
Dr. Céline Chu
Laboratory of Pharmacology
Department Pharmacy
Paul Brousse Hospital –APHP
14 avenue Paul Vaillant Couturier
94800 Villejuif France
Phone +33-1-45-59-65-68
Fax +33-1-45-59-37-16
Email celinechu82@yahoo.fr

Conflicts of interests: none

Abstract

Aims: Cetuximab, a monoclonal antibody directed towards epidermal growth factor receptor, is associated to irinotecan in patients treated for metastatic colorectal cancer who did not respond to irinotecan-based therapy. The mechanism of this successful clinical reversion remains unknown. In a previous study, we showed that cetuximab could inhibit P-glycoprotein (P-gp) in vitro, an efflux protein of the ATP-binding cassette family and as a consequence could lead to an increase of intracellular concentration.

In most of the studies, irinotecan is given intravenous. P-gp is present in both intestinal epithelial membrane and biliary canalicular. Since irinotecan is P-gp substrate, we evaluated here the cetuximab effect on pharmacokinetics of irinotecan given orally.

Main methods: Pharmacokinetics of irinotecan (40 mg/kg) and of its active metabolite SN-38 were measured after irinotecan oral administration in mice either alone or after 2 days of pretreatment with cetuximab (90 mg/kg).

Key findings: No difference of irinotecan and SN-38 AUCs were observed between the two groups. It was observed that the remaining plasmatic concentration of irinotecan and SN-38 could be measured until 8 h in mice pretreated by ceuximab and until 4 h in mice given irinotecan alone.

Significance: Pretreatment with cetuximab did not modify irinotecan oral bioavaibility as measured on the AUC, but it increased irinotecan and SN-38 remaining plasmatic concentrations. This could partly explain why cetuximab could reverse irinotecan resistance by delaying its elimination by inhibition of efflux transporters as P-gp.

Key words: cetuximab; irinotecan; SN-38; pharmacokinetics; mice; efflux transporters.

1. Introduction

Over the past decade, the response rate and overall survival of patients treated for a metastatic colorectal cancer were significantly increased due to the development of targeted therapies such as monoclonal antibodies directed against growth factors VEGF (vascular endothelial growth factor) and EGF (epidermal growth factor). Cetuximab (Erbitux®) is an IgG1 chimeric monoclonal antibody directed against EGFR. Signalling pathways of EGFR are involved in controlling cell survival, the cell cycle progression, angiogenesis, migration and cell invasion, and metastatic potential of cells. Cetuximab binds to EGFR with an affinity that is approximately 5 to 10 times higher than that of endogenous ligands. Cetuximab is given to patients treated for metastatic colorectal cancer in combination with irinotecan (Campto®) when irinotecan-based therapy has failed (Cunningham et al. 2004; Prewett et al. 2002). However, the mechanism of this successful clinical reversion remains unknown.

Irinotecan, a topoisomerase I inhibitor, is widely used in first- and second-line of treatment of advanced colorectal cancer. Irinotecan is converted into its active metabolite SN-38, which is approximately 100 to 1.000-fold more cytotoxic than the parent drug (Xu et al. 2002a).

Irinotecan and SN-38 undergo an extensive metabolism by various polymorphic enzymes leading to very complicated pharmacokinetics and thus, have been the subject of intensive investigation in recent years (Smith et al. 2006; Van der Bol et al. 2011a,b). Irinotecan is metabolized into SN-38 by carboxylesterases type 1 and 2. Competing with the formation of SN-38 is the oxidation of irinotecan into the inactive metabolites APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]-carbonyloxycampthotecin) and NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino)-carbonyloxy-camptothecin) by CYP3A4 and CYP3A5, which can be partially further converted into SN-38. SN-38 is further conjugated by UGT (UDP-glucuronosyltransferase) isoforms to form an inactive β-glucuronic acid conjugate, SN-38G to be eliminated by biliary and renal excretion. It is thought that liver is primarily responsible for activation of irinotecan to SN-38. However, in the intestines SN-38G can be

transformed back into SN-38 by bacterial β-glucuronidase (Van der Bol et al. 2011a). β-glucuronidase and carboxylesterase activities were also observed in normal colorectal and tumour tissue in in vivo studies, which could contribute to its activation (Xu et al. 2002b). Elimination of irinotecan is also dependent on drug-transporting proteins from the ATP-binding cassette drug-transporters family, notably P-glycoprotein (P-gp), multi-drug resistance-associated protein gene (MRP) and Breast Cancer Resistance protein (BCRP) (Prewett et al. 2002; Arimori et al. 2003).

An inhibition of activity of these drug transporters due to interaction with other drugs could increase irinotecan and SN-38 plasma concentration due to an alteration of their efflux and thus modify their anticancer activities and toxicities (Bansal et al. 2009). In a previous study, we showed that cetuximab could inhibit P-gp in vitro and thus increase doxorubicin (P-gp substrate) intracellular accumulation (Chu et al. 2012). Considering as an interesting hypothesis to explain resistance reversion of irinotecan by cetuximab, comparative pharmacokinetic studies were conducted in mice to evaluate cetuximab effect on irinotecan disposition.

In most of the studies irinotecan is given intravenously (Czejka et al. 2010; Pierga et al. 2010) but it has been given orally in early clinical studies (Schoemaker et al. 2005; Soepenberg et al. 2005). P-gp is present in intestinal epithelial membrane and biliary canalicular. Thus, oral route is an interesting administration route to evaluate cetuximab effect on irinotecan as the antibody could inhibit both intestinal and biliary P-gp.

The objective of tour study was to document cetuximab influence on oral irinotecan bioavaibility in mice.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs

Irinotecan (Campto®) was obtained from Pfizer (Montrouge, France). Cetuximab (Erbitux®) was purchased from Merck Serono (Lyon, France).

2.2. Animals

Animal experiments were carried out according to French and European laws and regulations. The protocol ethics were institutionally approved. The mice were caged under standard laboratory sterile conditions, with sterile water and regular chow provided ad libitum in a 12h/12h-light/dark cycle at a 21-23°C temperature. Anesthesia was obtained with 5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane in air. Female severe combined immunodeficiency (SCID) nude mice, 7 week old, weighing 15 to 25g were purchased from Animal and Veterinary Resources, IFR54 (Villejuif, France).

2.3. Irinotecan and SN-38 Pharmacokinetic Studies

Mice were randomized into two groups. The first group called CPT-11_{alone} group orally received irinotecan at 40 mg/kg. The second group called CPT-11_{cetux} group intraperitoneally received cetuximab at 90 mg/kg on day 1 and 3 then orally received irinotecan at 40 mg/kg on day 4.

For irinotecan and SN-38 assay, blood samples (0.5 ml on average) were collected in heparinized tubes at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 h after irinotecan administration, three mice per point. Blood samples were centrifuged for 10 min at 5000 rpm. Plasma were harvested into clean tubes and immediately analyzed as described below.

2.4. Irinotecan and SN-38 quantification in plasma

Irinotecan and SN-38 plasma concentrations were measured using a revised RP-HPLC with fluorescence detector. Quantification followed solid-phase extraction. For analysis, 100 µl of plasma was mixed with 200 µl of acetonitril acidified (to 1 ml acetonitril add 50 µl acetic acid). The mixture was vortexed for 10 s and centrifuged for 10 min at 5000 rpm.

Supernatant were harvested into clean tubes and then evaporated under a gentle stream of nitrogen at 30°C. The residue was reconstituted in acetonitrile/acetic acid mixture (70/30) acidified with trifluoroacetic acid (to 10 ml of mixture add 30 µl trifluoroacetic acid) and vortexed for 20s. An aliquot of 100 µl was then injected into the chromatographic system. Chromatographic analysis was accomplished using a Nucleosil C_{18} column (4.6 * 125 mm, 3µ) (Interchim, Montluçon, France) with a mobile phase delivered at a flow rate of 1.2 ml/min. The eluent was monitored at 260 nm. The CPT-11 and SN-38 standard curves were correctly described by unweighted least- square linear regression. Over the CPT-11 (or SN-38) plasma concentration range of 10 to 2500 ng/ml (5 to 1250 ng/ml), the determination coefficient (R2) of the calibration curves remained >0.99. Based on quality control samples, the overall relative S.D. (an index of precision) was less than 12%. The CPT-11 and SN-38 lower limit of quantification were 10 and 5 ng/ml. Three CPT-11 and SN-38 quality controls were prepared, low (30 and 15 ng/ml), medium (750 and 375 ng/ml), and high (2000 and 1000 ng/ml).

2.5. Data analysis

Since each animal provided only one sample of blood, data from animals of the same group were pooled using a naive averaging data approach (Burtin et al. 1996). The non-compartmental analysis was performed using WinNonlin professional version 5.2 software (Pharsight, Mountain View, CA). Beyond the sampling point at 4 hr in the $CPT\text{-}11_{alone}$ group, irinotecan and SN-38 plasma concentrations were below the LLOQ values.Thus, only were included for the pharmacokinetic analysis in the $CPT\text{-}11_{alone}$ group, sampling points from 0.25 h to 4 h. For the pharmacokinetic analysis in the $CPT\text{-}11_{cetux}$ group, all sampling times from 0.25 h to 8 h were included. At 8 h, irinotecan and SN-38 plasma concentrations were just above the limit of quantification. The mean maximum concentrations (C_{max}) and the times necessary to reach it (T_{max}) were evaluated from experimental curves. Irinotecan and SN-38 elimination half-lifes ($t_{1/2}$) were calculated from the respective elimination rate constants (K_e), estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the mean matrix concentration versus time curve, by linear regression analysis. The mean areas under the concentration-time curves (AUC) were calculated by the trapezoidal method from 0 to the last concentration time point. Irinotecan and SN-38 remaining concentrations were defined

as the last quantifiable concentrations. Irinotecan and SN-38 AUC of both groups (CPT-11_{alone} vs. CP¨T-11_{cetux}) were compared using Bailer's method (Bailer 1998). C_{max} were compared using a Student's t test with a significant level at 0.05. As T_{max} and half-lives are unique values, their variation after a cetuximab pretreatment were described but statistical test cannot be carried.

3. Results

3.1. Cetuximab effect on irinotecan pharmacokinetic study

Irinotecan results of the non-compartmental analysis in CPT-11_{alone} and in CPT-11_{cetux} groups are summarized in Table 1.

AUC were not significantly different between both groups (Fig. 1). The T_{max} tended to decrease from 1 h to 0.25 h in CPT-11_{cetux} group. The elimination half-lives were comparable (1.0 h vs. 1.1 h). Irinotecan remaining concentration could be quantified until 8 h in CPT-11_{cetux} group (10.83 ± 1.46 μg/ml) and until 4 h in CPT-11_{alone} group (68.03 ± 36.53 μg/ml).

3.2. Cetuximab effect on SN-38 pharmacokinetic study

SN-38 results of the non-compartmental analysis in CPT-11_{alone} and in CPT-11_{cetux} groups are summarized in Table 2.

SN-38 AUC were not significantly different between both groups (Fig. 2). The T_{max} tended to decrease from 0.5 h to 0.25 h in CPT-11_{cetux} group. CPT-11_{cetux} group half-life of elimination was 1.5-fold higher than those of CPT-11_{alone} group (1.7 h vs. 1.1 h). SN-38 remaining concentration could be quantified until 8 h in CPT-11_{cetux} group (18.81 ± 2.74 μg/ml) and until 4 h in CPT-11_{alone} group (78.83 ± 16.11 μg/ml).

4. Discussion

Cetuximab effect on pharmacokinetic profiles of irinotecan given orally and of its active metabolite SN-38 had been measured in order to understand cetuximab influence on irinotecan metabolism and elimination.

Irinotecan pharmacokinetics parameters were compared between two mice groups pretreated or not by cetuximab. Although AUC were not significantly different between both groups, intestinal permeability of irinotecan may have been enhanced in cetuximab treated group since T_{max} is shorter (1 h vs. 0.25 h).

Inter-conversion phenomenon occurring between lactone and carboxylate forms of irinotecan could explain the absence of significant difference between mean C_{max} of both group (Arimori et al. 2003; Mullangi et al. 2010). The lactone form is stable at pH 6.0 and lower. At pH higher than 6.0, conversion of lactone to carboxylate forms becomes evident and at pH 8.0 and above the predominant species present are carboxylate forms (Mullangi et al. 2010). Lactone forms of irinotecan and SN-38 are non-ionic in the blood, and non-ionized forms would be expected to permeate freely through capillary walls to the gastrointestinal tract. On the other hand, it has also been shown in in vivo study that efflux transporters as P-gp could be involved in the exsorption of irinotecan lactone forms across intestinal membrane (Arimori et al. 2003). Hence, the absence of significant difference between irinotecan mean C_{max} in our study could be explained by the fact of predominant presence of lactone forms in intestines indicating that its absorption in intestines levels is controlled only by passive diffusion phenomenon with a little impact of P-gp transport. Remaining concentration could be measured until 8 h in mice group treated by cetuximab and until 4 h in mice group treated by irinotecan alone. The persistence of remaining plasmatic concentration in cetuximab treated group could be explained by a delay of irinotecan biliary elimination following a cetuximab pretreatment.

We also measured SN-38, the active metabolite of irinotecan. SN-38 AUC were not significantly different between both groups. In cetuximab treated mice group SN38 T_{max} appeared earlier (0.5 h vs. 0.25 h), which is in relation with irinotecan T_{max} at 0.25 h. It is difficult to evaluate modification of SN-38 absorption in mice since irinotecan is mostly metabolized in SN-38 in liver (Van Riel et al. 2004). In addition, plasma of several species, including mouse and horse, contains high levels of esterases other than carboxylesterases and as a consequence converts irinotecan much better into SN-38 than human plasma does (Duysen et al. 2011; Wierdl et al. 2008). Finally, it has not been described that cetuximab could have influence on carboxylesterases. Hence, since cetuximab did not modify

irinotecan AUC, it is coherent that it did not influence SN-38 AUC. We observed that a pretreatment by cetuximab lead to persistence of SN-38 plasmatic remaining concentration as well as a 1.5-fold increase of SN-38 half-time elimination. We could thus safely suppose that cetuximab delays biliary excretion of both irinotecan and SN-38. This last result is interesting for clinical use since SN-38 is 100 to 1.000-fold more efficient than irinotecan. It has been shown in patients treated by imatinib for chronic myeloid leukaemia that higher plasma remaining concentrations correlate with clinical responses (Koren-Michowitz et al. 2012; Picard et al. 2007).

Fecal excretion is a major route of elimination for irinotecan compared with the renal pathway and CYP3A-mediated metabolism. Impaired biliary elimination of irinotecan and its metabolites is likely to be the main mechanism responsible for reduced irinotecan clearance rather than the inhibition of irinotecan oxidation. Data collected so far point toward P-gp and MRP as the 2 main transporters of ATP binding cassette transporters family involved in irinotecan and SN-38 biliairy elimination (Iyer et al. 2002; Mathijssen et al. 2001). In a rat perfusion model, significant inhibition of biliary excretion rates and biliary clearance values of both irinotecan and SN-38 was observed after treatment with ciclosporin (inhibitor of P-gp and MRP) associated with increased systemic exposure to irinotecan and metabolites (Arimori et al. 2003). In a previous study, we showed that cetuximab could inhibit P-gp in vitro and thus increase doxorubicin, a P-gp substrate, intracellular accumulation (Chu et al., 2012). It has been proven that EGF can modulate the phosphorylation then increase P-gp functionality (Yang et al. 1997). Treatment of multidrug resistant cell with EGF led to a consistent decrease in accumulation of vinblastin, a P-gp substrate. The fact that the antibody prevents EGF binding, one of our hypotheses is cetuximab could decrease P-gp functionality by this pathway.

By decreasing irinotecan and SN-38 biliairy elimination, cetuximab could increase their steady state concentration and thus, increase their concentration in tissues and probably improve their anti-tumor efficiency. Finally, our results could partly explain the mechanism of the successful clinical reversion of cetuximab used in the metastatic forms of colorectal cancer in combination with irinotecan-based therapy in patients who have not

responded to irinotecan- based therapy (Cunningham et al. 2004). However, further investigations are necessary to evaluate cetuximab effect on irinotecan tumoral concentration. Also, cells acquire irinotecan resistance by several mechanisms (Xu et al. 2002a). EGFR inhibition by cetuximab may also overcome this resistance by restoring apoptosis or impairing DNA-repair activity (Huang et al. 2000; Sclabas et al. 2003).

5. Conclusion

Persistence of remaining plasmatic concentrations of irinotecan and its active metabolite SN-38 in mice treated by cetuximab could indicate a delay of their elimination due to a cetuximab pretreatment and explain why cetuximab could reverse irinotecan resistance through inhibition of efflux transporters such as P-glycoprotein.

6. References

Arimori K, Kuroki N, Hidaka M, Iwakiri T, Yamsaki K, Okumura M, Ono H, Takamura, N, Kikuchi M, Nakano M. Effect of P-glycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. Pharm Res 2003;20(6):910-17.

Bailer AJ. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques. J Pharmacokinet Biopharm 1998;16(3):303–09.

Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. Eur J Pharm Sci 2009;36(4-5):580-90.

Burtin P, Mentre F, van Bree J, Steimer JL. Sparse sampling for assessment of drug exposure in toxicological studies. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1996;21(2):105–11.

Chu C, Abbara C, Noël-Hudson MS, Bénard J, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. In vivo and in vitro evidence of the effect of Erbitux® on drug substrates of ABCB1. FIRN 2012.

Czejka M, Gruenberger B, Kiss A, Farkouh A, Schueller J. Pharmacokinetics of irinotecan in combination with biweekly cetuximab in patients with advanced colorectal cancer. Anticancer Res 2010;30(6):2355-60.

Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. Clin Cancer Res 2002;8(5):994-1003.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004;351(4):337-45.

Duysen EG, Lockridge O. Prolonged toxic effects after cocaine challenge in butyrylcholinesterase/plasma carboxylesterase double knockout mice: a model for butyrylcholinesterase-deficient humans. Drug Metab Dispos 2011;39(8):1321-23.

Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor and DNA-dependant protein kinase in mammalian cells. J Biol Chem 2000;273:1568-73.

Iyer L, Ramirez J, Shepard DR, Bingham CM, Hossfeld DK, Ratain MJ, Mayer U. Biliary transport of irinotecan and metabolites in normal and P-glycoprotein-deficient mice. Cancer Chemother Pharmacol 2002;49:336–41.

Koren-Michowitz M, Volchek Y, Naparstek E, Gavish I, Levi I, Rowe JM, Shimoni A, Nagler A. Imatinib plasma trough levels in chronic myeloid leukaemia: results of a multicentre study CSTI571AIL11TGLIVEC. Hematol Oncol. 2012. doi: 10.1002/hon.2005.

Mathijssen RH, Van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A.Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 2001;7(8):2182-94.

Mullangi R, Ahlawat P, Srinivas NR. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. Biomed Chromatogr 2010;24:104-23.

Picard S, Titier K,. Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, Lassale R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon FX. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. Blood 2007;109(8):3496-99.

Pierga JY, Dieras V, Faivre S, Laurence V, Vedovato JC. Pharmacokinetic profile of cetuximab (Erbitux) alone and in combination with irinotecan in patients with advanced EGFR-positive adenocarcinoma. Eur J Cancer 2005;41(12):1739-45.

Schoemaker NE, Kuppens IE, Huinink WW, Lefebvre P, Beijnen JH, Assadourian S, Sanderink GJ, Schellens JH. Phase I study of an oral formulation of irinotecan administered daily for 14 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumours. Cancer Chemother Pharmacol 2005;55(3):263-70.

Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Fan Z, Evans DB, Chiao PJ. Restoring apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting the nuclear factor-kappaB signaling pathway with the anti-epidermal growth factor antibody IMC-225. J Gastrointest Surg 2003;7:37-43.

Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. Toxicol In Vitro 2006;20(2):163-75.

Soepenberg O, Dumez H, Verweij J, Semiond D, deJonge MJ, Eskens FA, ter Steeg J, Selleslach J, Assadourian S, Sanderink GJ, Sparreboom A, van Oosterom AT. Phase I and pharmacokinetic study of oral irinotecan given once daily for 5 days every 3 weeks in combination with capecitabine in patients with solid tumors. J Clin Oncol 2005;23(4):889-98.

Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, Aulds S, Crawford M, Gallagher J, Eyers T, Rivory L. The in vitro metabolism of irinotecan (CPT-11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. Br J Clin Pharmacol 2006;62(1):122-29.

Van der Bol JM, Loos WJ, de Jong FA, van Meerten E, Konings IR, Lam MH, de Bruijn P, Wiemer EA, Verweij J, Mathijssen, RH. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics and toxicities of irinotecan in cancer patients: a prospective cross-over drug-drug interaction study. Eur J Cancer 2011a;47(6):831-38.

Van der Bol JM, Visser TJ, Loos WJ, de Jong FA, Wiemer EA, van Aken MO, Planting AS, Schellens JH, Verweij J, Mathijssen HH. Effects of methimazole on the elimination of irinotecan. Cancer Chemother Pharmacol 2011b;67(1):231-36.

Van Riel JM, Van Groeningen CJ, De Greve J, Gruia G, Pinedo HM, Giaccone G. Continuous infusion of hepatic arterial irinotecan in pretreated patients with colorectal cancer metastatic to the liver. Ann Oncol 2004;15(1):59-63.

Wierdl M, Tsurkan L, Hyatt JL, Edwards CC, Hatfield MJ, Morton CL, Houghton PJ, Danks MK, Redinbo MR, Potter PM. An improved human carboxylesterase for enzyme/prodrug therapy with CPT-11. Cancer Gene Ther 2008;15(3):183-92.

Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. Ann Oncol 2002a;13(12):1841-51.

Xu G, Zhang W, Ma MK, McLeod HL. Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan. Clin Cancer Res 2002b;8(8):2605-12.

Yang JM, Sullivan GF, Hait WN. Regulation of the function of P-glycoprotein by Epidermal growth factor through phospholipase C. Bioch Pharm 1997;53(11):1597-1604.

Figure 1
Irinotecan plasmatic concentrations after oral administration of irinotecan (40 mg/kg) either given alone or after a pre-treatment by cetuximab (90 mg/kg) in nude mice (n = 3 per group).

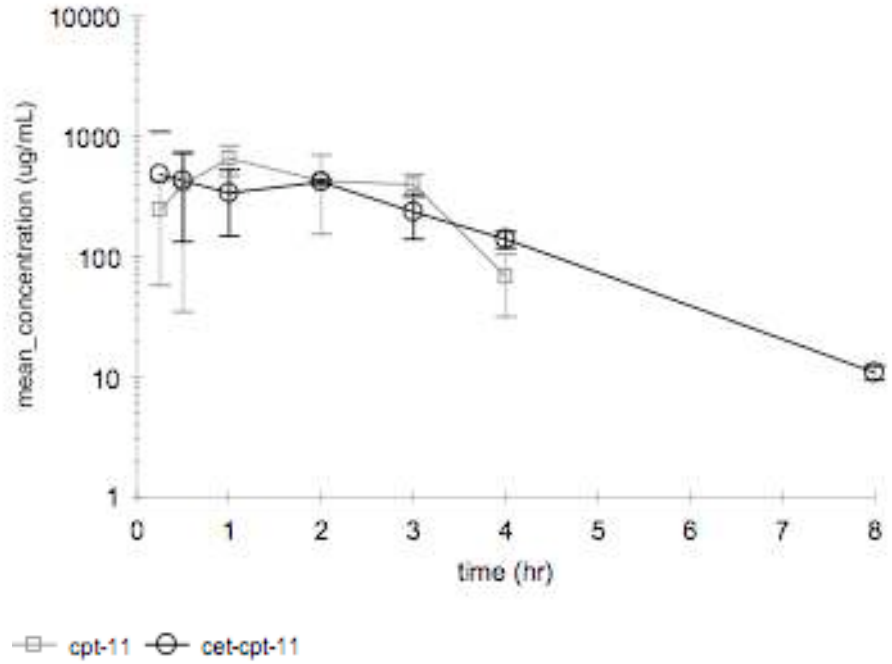


Figure 2
SN-38 plasmatic concentrations after oral administration of irinotecan (40 mg/kg) either given alone or after a pre-treatment by cetuximab (90 mg/kg) in nude mice (n = 3 per group).

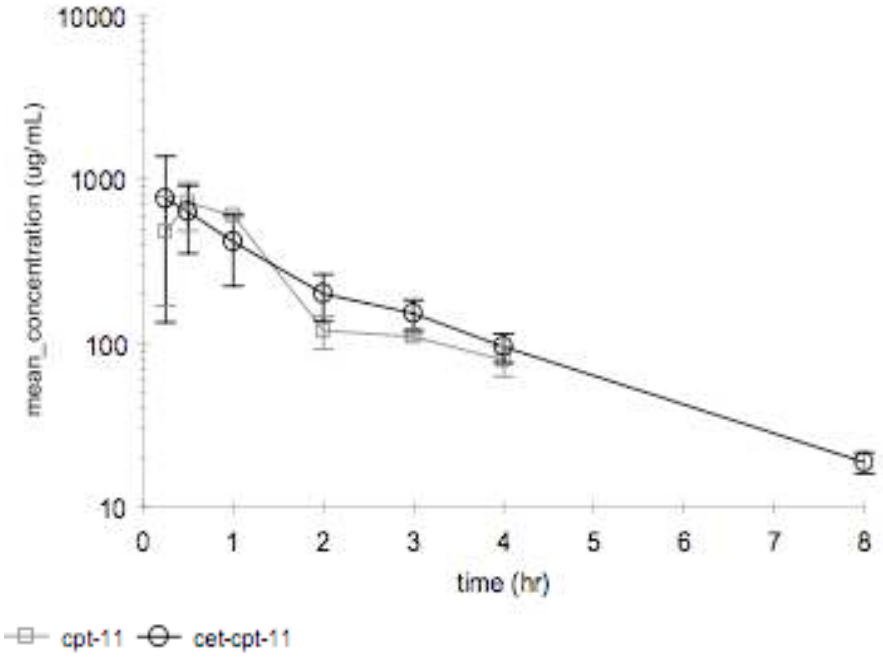


Table 1

Pharmacokinetic parameters of irinotecan after oral administration (40 mg/kg) obtained by a non-compartimental analysis in nude mice

	CPT-11	CPT-11 + cetuximab	*p*
Cmax (µg/ml)	653 +/- 183	481 +/- 612	NS
Tmax (h)	1	0.25	
AUC (h*µg/ml)	1525 +/- 204	1498 +/- 130	NS
t1/2 (h)	1.0	1.1	
Conc at 4 h (µg/ml)	68.0 +/- 36.5	139.5 +/- 21.9	
Conc at 8 h (µg/ml)	< LOQQ	10.8 +/- 1.5	

Table 2

Pharmacokinetic parameters of SN-38 after irinotecan oral administration (40 mg/kg) obtained by a non-compartimental analysis in nude mice

	CPT-11	CPT-11 + cetuximab	*p*
Cmax (µg/ml)	721+/- 236	758 +/- 624	NS
Tmax (h)	0.5	0.25	
AUC (h*µg/ml)	1169 +/- 55	1272 +/- 123	NS
t1/2 (h)	1.1	1.7	
Conc at 4 h (µg/ml)	78.8 +/- 16.1	95.1 +/- 19.3	
Conc at 8 h (µg/ml)	< LOQQ	18.8 +/- 2.7	

IV. Résultats de l'article 3

1. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique de l'irinotécan

Les pharmacocinétiques comparatives de l'irinotécan n'ont pas montré de différence significative entre l'AUC des deux groups de souris: $Irinotécan_{seul}$ et $Irinotécan_{cetux}$. Le temps maximal d'absorption (T_{max}) a été réduit de 1 h à 0,25 h dans le groupe $Irinotécan_{cetux}$. La perméabilité intestinale a donc été augmentée. Les concentrations résiduelles étaient quantifiables pendant 8 h dans le groupe $Irinotécan_{cetux}$ (10.83 ± 1.46 ng/ml) et pendant 4 h dans le groupe $Irinotécan_{seul}$ (68.03 ± 36.53 ng/ml). Les demi-vies d'élimination étaient comparables (1,0 h *vs.* 1,1 h).

2. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique du SN-38

Les pharmacocinétiques du SN-38 n'ont pas montré de différence significative entre l'AUC des deux groupes de souris: $Irinotécan_{seul}$ et $Irinotécan_{cetux}$. Les concentrations résiduelles du SN-38 étaient quantifiables jusqu'au temps 8 h pour le groupe $Irinotécan_{cetux}$ (18.81 ± 2.74 ng/ml) et jusqu'à 4 h pour le groupe $Irinotécan_{seul}$ (78.83 ± 16.11 ng/ml). Une augmentation de la demi-vie d'élimination de 1,5 fois a été observée dans le groupe $Irinotécan_{cetux}$ par rapport au groupe $Irinotécan_{seul}$ (1,7 h *vs.* 1 h).

Comme nous le montre la mesure des AUCs, un prétraitement par le cétuximab ne semble pas modifier la biodisponibilité orale de l'irinotécan. En revanche, il augmente les concentrations plasmatiques résiduelles de l'irinotécan et du SN-38.

V. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale de l'irinotécan chez la souris nude porteuse d'une xénogreffe colorectale humain

1. Méthodologie

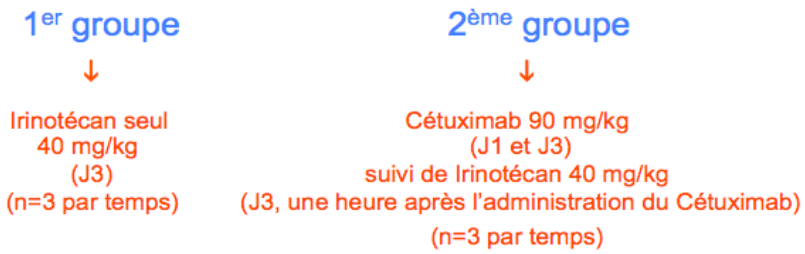
Le modèle de xénogreffe de cancer colorectal humain IGROV1-016P, utilisé dans cette étude, est décrit dans la section II chapitre 5.1. Les tests pharmacologiques effectués sur ce modèle ont montré que la tumeur est sensible au 5-FU et à l'irinotécan mais en revanche résistant à l'oxaliplatine et au cétuximab (du fait qu'elle soit KRAS muté).
Après plusieurs échecs de premiers passages d'une xénogreffe de cancer colorectal humain KRAS sauvage sur des souris nude, nous avons retenu le modèle de xénogreffe IGROV-016P pour cette étude bien qu'elle soit résistante au cétuximab.

Il s'agissait donc d'étudier l'effet du cétuximab, administré en même temps que l'irinotécan donné par voie orale, sur les concentrations plasmatiques et tumorales de l'irinotécan et de son métabolite, le SN-38 et non de tester l'efficacité de l'association du cétuximab avec l'irinotécan. Une fois que la présence de l'EGFR (cible pharmacologique du cétuximab) était confirmée, ce modèle de xénogreffe nous semblait suffisant pour étudier les interactions cinétiques entre les deux médicaments.

La doxorubicine s'accumule dans des cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp après co-traitement des cellules par de la doxorubicine et du cétuximab, alors qu'elle ne s'accumule pas après prétraitement à long terme des cellules par du cétuximab seul. Nos résultats *in vitro* nous ont conduit à modifier le schéma d'administration du cétuximab et de l'irinotécan dans cette étude. L'administration du cétuximab en concomitance avec l'irinotécan permet en effet de tester une inhibition fonctionnelle de la P-gp par le cétuximab. Elle reflète également la réalité clinique puisque le cétuximab est administré le même jour que l'irinotécan chez l'homme.

Ainsi, le premier groupe de souris reçoit l'irinotécan seul par voie orale à la dose de 40 mg/kg ($Irinotécan_{seul}$). Le deuxième groupe de souris reçoit du cétuximab en intra péritonéale à la dose de 90 mg/kg à J1 et J3 puis reçoit de l'irinotécan par voie orale à la dose de 40 mg/kg ($Irinotécan_{cetux}$), une heure après l'injection de cétuximab à J3. Les voies d'administration et les temps de prélèvements restent les mêmes.

Ci-joint, le nouveau schéma d'administration:



2. Dosage de l'irinotécan et du SN 38 dans la tumeur par HPLC

Principe

Les concentrations d'irinotécan et de SN-38 dans les tumeurs ont été mesurées par chromatographie phase liquide haute performance (HPLC) en phase inversée et détectées par fluorescence.

Extraction

Les échantillons de tumeur sont pesés à l'aide d'une balance de précision. Ils sont transférés dans des tubes eppendorf à fond conique et immergés dans 100 µl d'un mélange acétonitrile-eau (50/50, V/V). 200 µl d'acétonitrile acidifié est additioné à la mixture (pour 1 ml d'acétonitrile est ajouté 50 µl d'acide acétique). Les tubes sont ensuite vortexés 10 s et centrifugés pendant 4 min à 5000 rpm. Les surnageants sont récupérés dans des tubes propres en verre de 5 ml. L'extraction est répétée 4 fois. Les surnageants sont récupérés dans les mêmes tubes en verre.

Le solvant de chaque tube est évaporé sous un léger flux d'azote dans le bain marie à 30°C. Le résidu sec est repris par un mélange de 200 µl de solution de tetra butyl ammonium et d'acétonitrile (TBA/ACN, 70/30, V/V) acidifié par de l'acide trifluoroacétique (TFA) (pour 10 ml du mélange de TBA/ACN est ajouté 30 µl TFA) puis vortexé pendant 10 s.
Un aliquot de 100 µl est ensuite injecté dans le système HPLC.

Système HPLC

Le système chromatographique comprend une colonne Nucleosil C_{18} (4.6 * 125 mm, 3µ) (Interchim, Montluçon, France) où circule une phase mobile (solution de tetra butyl ammonium 0,0025M, pH = 3,2) délivrée à un débit de 1,2 ml/min. Le détecteur à fluorescence est réglé à 260 nm.

Gamme d'étalonnage et contrôles qualités

La gamme d'étalonnage est faite à partir de tumeurs vierges surchargées par des quantités croissantes d'irinotécan et de SN-38. Elle comprend 7 points de gamme, allant de 0,5 à 50 ng/g pour l'irinotécan, et, de 0,25 à 25 ng/g pour le SN-38. Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage était toujours supérieur à 0,99. Les limites de quantification sont de 0,5 ng/g pour l'irinotécan et de 0,25 ng/g pour le SN-38. Trois niveaux de contrôles qualités d'irinotécan et de SN-38 ont été réalisés en déposant les quantités suivantes : contrôle bas (1,5 et 0,75 ng/g), moyen (7,5 et 3,75 ng/g) et haut (40 et 20 ng/g).

Analyse pharmacocinétique

Une analyse non-compartimentale des principaux paramètres pharmacocinétiques (AUC, Cmax, Tmax, demi-vie d'élimniation, concentration résiduelle) a été effectuée à l'aide du logiciel WinNonlin version 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA). Les AUCs de l'irinotécan et du SN-38 des deux groupes ($Irinotécan_{seul}$ *vs*. $Irinotécan_{cetux}$) ont été comparées par un test de Bailer avec un seuil de significativité $Z > 1,96$. Les Cmax et les concentrations résiduelles ont été compares à l'aide d'un test de Student avec un seuil de significativité $p < 0,05$.

3. *Résultats*

3.1. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale de l'irinotécan

Au niveau plasmatique, les T_{max} sont observés 2 h après l'administration d'irinotécan pour les deux groupes, le cétuximab ne modifie pas le temps nécessaire à la concentration plasmatique pour atteindre sa valeur maximale. L'AUC de l'irinotécan est 1,3 fois plus grande dans le groupe traité par le cétuximab mais cette augmentation est non significative. Les demi-vies d'élimination sont similaires (1,4 h *vs.* 1,3 h) et les concentrations résiduelles ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes.

	Irinotécan	Irinotécan + Cétuximab	
C_{max} (ng/ml)	835,9	657,8	p = 0,59 < 1,96 NS
T_{max} (h)	2	2	
AUC (ng/ml/h)	1660,2	2218,5	Z = 0,74 < 1,96 NS
Ratio AUC	1,3		
$C_{résiduelle}$ (ng/ml)	23,2	17,0	p = 0,48 > 0,05 NS
Demi-vie d'élimination (h)	1,4	1,3	

Tableau 3: Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg)

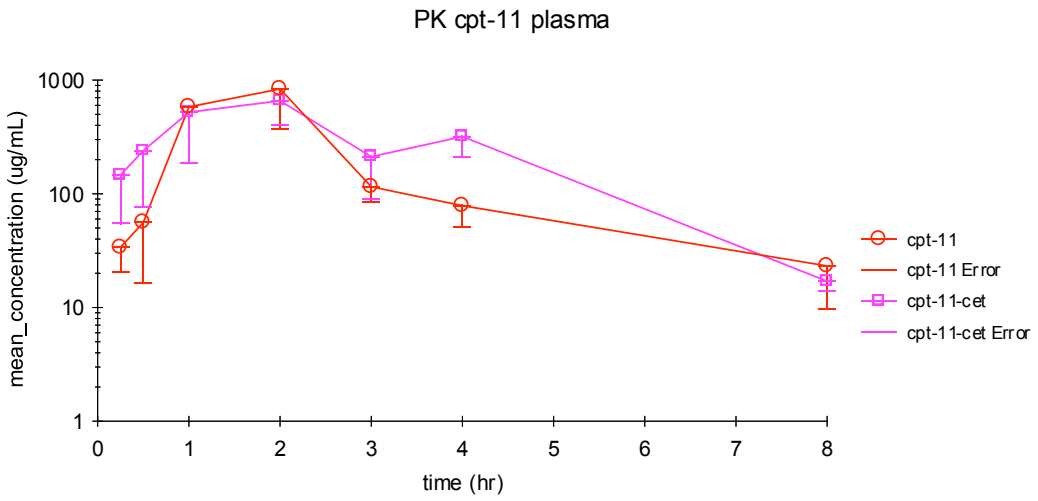


Figure 20: Pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) (3 souris par points)

Au niveau tumoral, l'AUC de l'irinotécan est 2 fois plus grande dans le groupe traité par le cétuximab mais cette augmentation n'est pas significative. Une augmentation de la demi-vie d'élimination est observée en faveur du groupe $Irinotécan_{seul}$ (3,73 h *vs.* 2,64 h). Les concentrations résiduelles ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes.

	Irinotécan	Irinotécan + Cétuximab	
C_{max} (ng/g)	2336,8	3541,6	p = 0,55 > 0,05 NS
Ratio C_{max}	1,5		
T_{max} (h)	2	4	
AUC (ng/g/h)	7070,8	13861,0	Z = 1,60 < 1,96 NS
Ratio AUC	2		
$C_{résiduelle}$ (ng/g)	507,4	442,8	p = 0,67 > 0,05 NS
Demi-vie d'élimination (h)	3,7	2,6	

Tableau 4: Paramètres pharmacocinétiques dans la tumeur de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg)

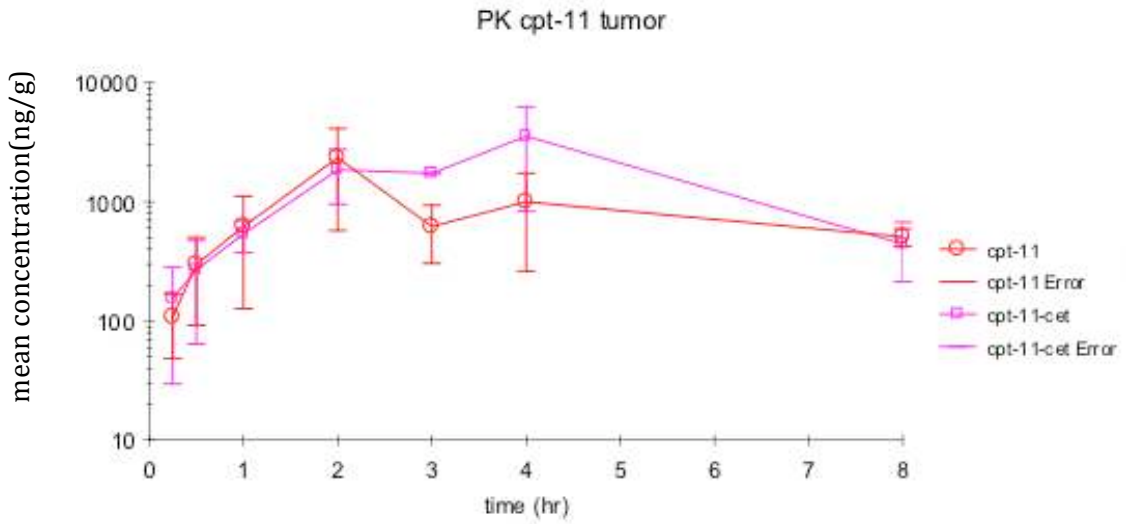


Figure 21: Pharmacocinétiques au niveau de la tumeur de l'irinotécan après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) (3 souris par temps)

Ainsi, dans le groupe de souris traitées par le cétuximab, on observe une élévation des AUCs plasmatique et tumorale de l'irinotécan mais qui ne sont pas significatives. Le cétuximab ne semble pas influencer d'une façon majeure l'élimination de l'irinotécan (concentrations résiduelles non significativement différentes au niveau plasmatique et tumoral) lorsqu'il est administré en concomitance.

3.2. Effet du cétuximab sur la pharmacocinétique plasmatique et tumorale du SN-38 chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale humain

Au niveau plasmatique, le T_{max} a été réduit de 1 h à 0,25 h dans le groupe $Irinotécan_{cetux}$ traduisant une augmentation de la perméabilité intestinale. Une augmentation significative de 1,7 fois de l'AUC du SN-38 est observée en faveur du groupe traité par le cétuximab (test de Bailer, Zobs = 2,26> 1,96). Les demi-vies d'élimination sont identiques (1,8 h *vs.* 1,7 h) et une augmentation de la concentration résiduelle de 1,2 fois est observée dans le groupe $Irinotécan_{cetux}$ mais elle est non significative.

	Irinotécan	Irinotécan + Cétuximab	
C_{max} (ng/ml)	726,3	884,3	p = 0,63>0,05 NS
Ratio C_{max}	1,2		
T_{max} (h)	1	0,25	
AUC (ng/ml/h)	1644,7	2805,1	Z = 2,26>1,96 S
Ratio AUC	1,7		
$C_{résiduelle}$ (ng/ml)	29,5	34,7	p = 0,69>0,05 NS
Demi-vie d'élimination (h)	1,8	1,7	

Tableau 5: Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg)

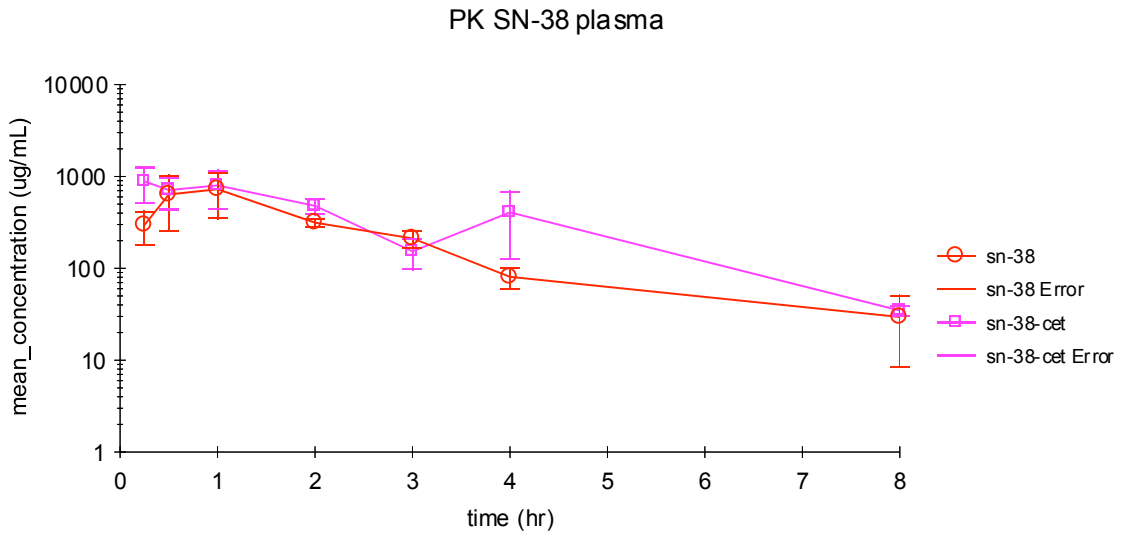


Figure 22: Pharmacocinétiques plasmatiques du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) (3 souris par points)

Au niveau tumoral, les T_{max} sont observés 2 h après l'administration d'irinotécan pour les deux groupes. Une augmentation significative de 1,7 fois de l'AUC du SN-38 est observée en faveur du groupe traité par le cétuximab (test de Bailer, Zobs = 3,40 > 1,96). Les demi-vies d'élimination sont comparables (11,6 h *vs.* 12,9 h) et les concentrations résiduelles ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes.

	Irinotécan	Irinotécan + Cétuximab	
C_{max} (ng/g)	363,4	423,3	p = 0,67 > 0,05 NS
Ratio C_{max}	1,2		
T_{max} (h)	2	2	
AUC (ng/g/h)	1297,4	2219,7	Z = 3,40 > 1,96 S
Ratio AUC	1,7		
$C_{résiduelle}$ (ng/g)	110,7	208,2	p = 0,24 > 0,05 NS
Demi-vie d'élimination (h)	11,6	12,9	

Tableau 6: Paramètres pharmacocinétiques dans la tumeur du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg)

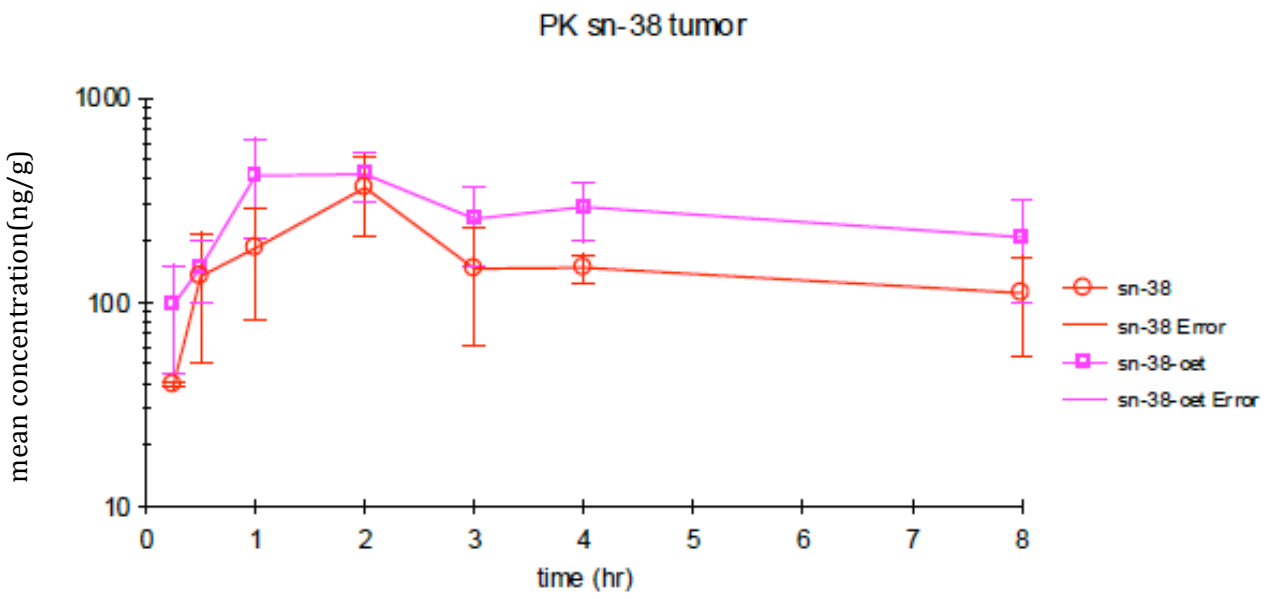


Figure 23: Pharmacocinétiques au niveau de la tumeur du SN-38 après administration par voie orale de l'irinotécan (40 mg/kg) chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale traitée ou non par le cétuximab par voie IP (90 mg/kg) (3 souris par points)

Dans le groupe de souris traitée par le cétuximab, on observe une élévation significative des AUCs plasmatique et tumorale du SN-38. Une augmentation significative de l'AUC du SN-38 dans le plasma sans une modification des demi-vies d'élimination peut se traduire par une déficience de la P-gp intestinale. Le cétuximab ne semble pas influencer d'une façon majeure l'élimination du SN-38 lorsqu'il est administré en concomitance (concentrations résiduelles plasmatiques et tumorales non significativement différentes et demi-vie d'élimination similaires). L'augmentation significative de l'AUC du SN-38 dans la tumeur est corrélée à une élévation significative de l'AUC plasmatique.

VI. Synthèse des études pharmacocinétiques chez la souris

1. Choix des doses

Les études pharmacocinétiques d'irinotécan administré par voie orale utilisent des doses allant de 20 à 80 mg/kg [19-21]. Une étude chez la souris montre que au delà de la dose de 40 mg/kg, la cinétique de l'irinotécan sous sa forme lactone n'est plus linéaire dû à une inhibition de sa clairance. Nous avons donc choisi la dose de 40 mg/kg pour éviter que l'élimination de l'irinotécan ne soit affectée [102].

L'étude préclinique chez la souris, évaluant l'activité anti-tumorale du cétuximab associée à l'irinotécan, utilise une dose de cétuximab de 0,5 et de 1 mg tous les trois jours sur une durée de 45 jours, soit 1,5 à 3 mg par semaine [2]. Nous avons choisi d'administrer le cétuximab deux fois par semaine à la dose de 90 mg/kg soit 3,6 mg pour une souris de 20 g par semaine. Les souris ne recevant que deux injections dans notre étude, nous avons choisi volontairement une dose élevée pour simuler une dose de charge comme chez l'Homme. Selon la monographie de l'Erbitux®, des études de toxicité d'une seule dose de cétuximab administré par voie IV chez des souris, à des doses allant de 282 à 300 mg/kg, n'ont pas révélées de toxicité [103].

2. Comparaison des deux schémas d'administration : cétuximab en pré-traitement ou en association avec l'irinotécan

Les premiers résultats de l'étude pharmacocinétique chez la souris nude normale ont montré qu'un prétraitement de deux jours par le cétuximab n'augmentait pas l'AUC de l'irinotécan et du SN-38 mais augmentait d'une façon significative leurs concentrations résiduelles.
Ces résultats nous ont amené à modifier le schéma d'administration pour les études pharmacocinétiques chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale humaine. Ainsi,

nous avons montré qu'une administration du cétuximab en concomitance avec l'irinotécan entraînait une augmentation des AUCs plasmatiques de l'irinotécan (non significative) et du SN-38 (significative).

Bien que le premier schéma d'administration ait été effectué sur des souris normales et le deuxième sur des souris porteuses d'une xénogreffe, nous nous permettons de comparer les deux schémas d'administration (Figures 25 et 25). En effet, il est maintenant bien établi que les tumeurs localisées en sous-cutané ne métastasent que très rarement, et se développent localement tout en étant entourées d'une capsule fibreuse [90]. Comme les tumeurs ont une courte durée de croissance (deux semaines), nous avons considéré que le métabolisme au niveau intestinal et biliaire de ces souris porteuses de tumeur était similaire à celui des souris normales.

Nous constatons que les ratios des concentrations moyennes plasmatiques d'irinotécan (des souris ayant reçues à la fois le cétuximab et l'irinotécan par rapport aux souris ayant reçues que l'irinotécan) sont plus élevés au temps 0,25 h et au temps 4 h dans le deuxième schéma d'administration (cétuximab administré en même temps que l'irinotécan) (Figure 24). Il en est de même pour le SN-38 (Figure 25).

En conclusion, le cétuximab, lorsqu'il est administré en concomitance inhiberait davantage l'efflux de l'irinotécan, administré par voie orale, au niveau intestinal (lors de l'absorption) et au niveau biliaire (lors du cycle entéro-hépatique).

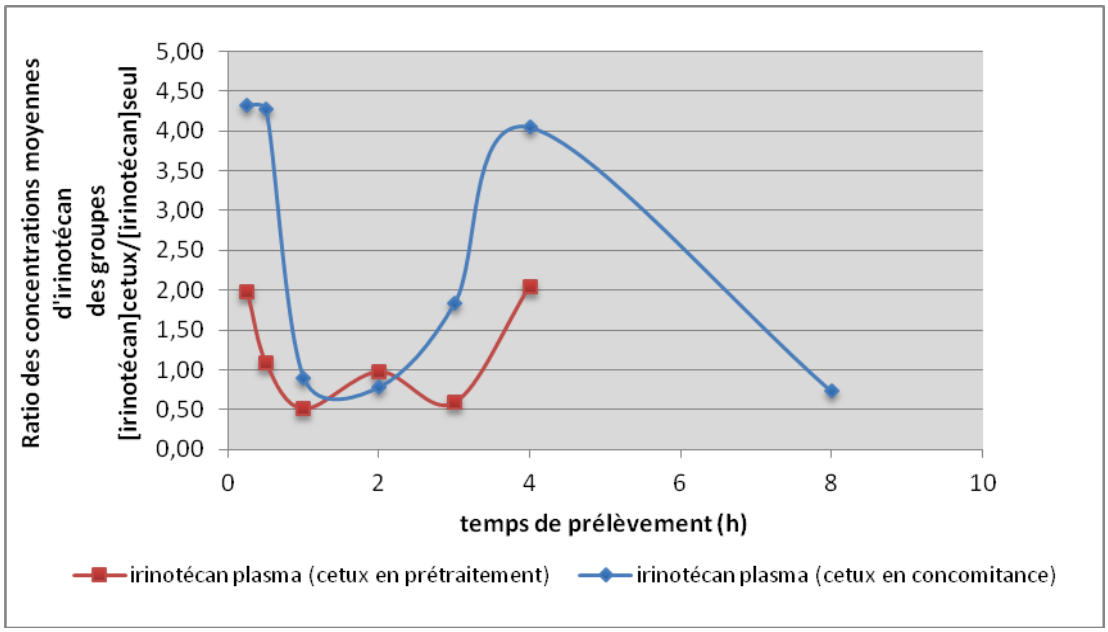


Figure 24: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques moyennes de l'irinotécan chez des souris ayant reçu les deux médicaments par rapport aux souris ayant reçu l'irinotécan seul, selon deux schémas d'administration du cétuximab : en prétraitement ou en concomitance

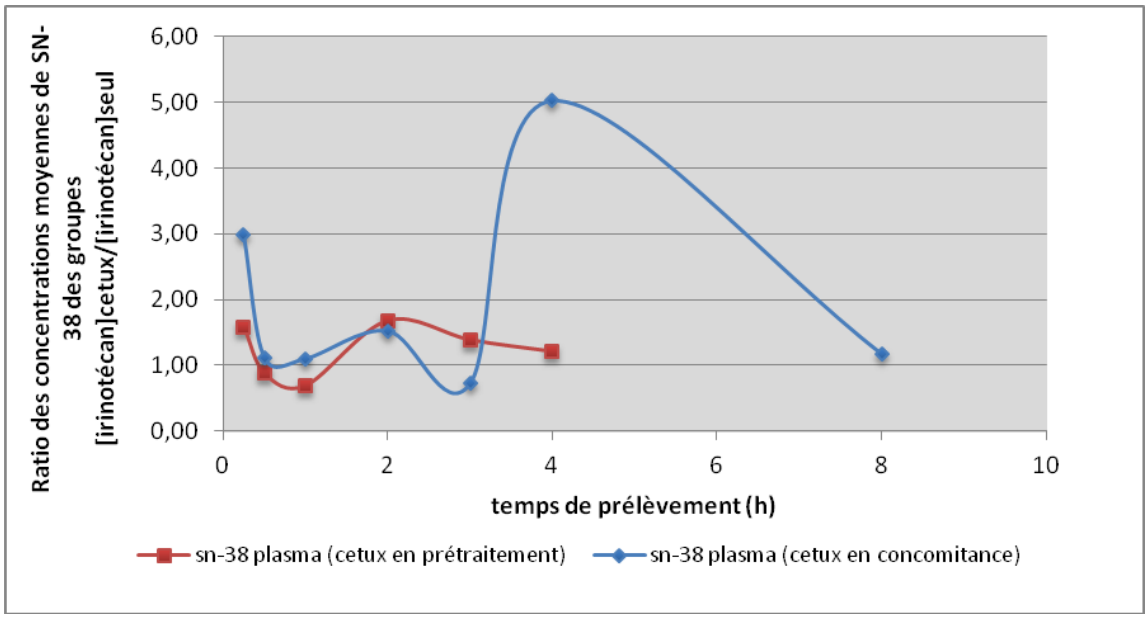


Figure 25: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques moyennes du SN-38 chez des souris ayant reçu les deux médicaments par rapport aux souris ayant reçu l'irinotécan seul, selon deux schémas d'administration du cétuximab: en prétraitement ou en concomitance

NB: La courbe s'arrête à 4 hpour le premier schéma d'admininstration car les concentrations plasmatiques étaient justes en dessous des limites de quantification pour l'irinotécan et le SN-38 dans le groupe traité par l'irinotécan seul.

3. effet du cétuximab administré en association avec l'irinotécan sur les concentrations plasmatiques et tumorales de l'irinotécan et du SN-38

En nous concentrant sur le deuxième schéma d'administration, plus intéressant du fait des différences d'AUC plasmatique observées (non significative pour l'irinotécan et significative pour le SN-38), nous avons représenté les ratios des concentrations de l'irinotécan, et, ceux du SN-38 chez des souris ayant reçu le médicament seul ou avec le cétuximab, dans le plasma (Figure 26).

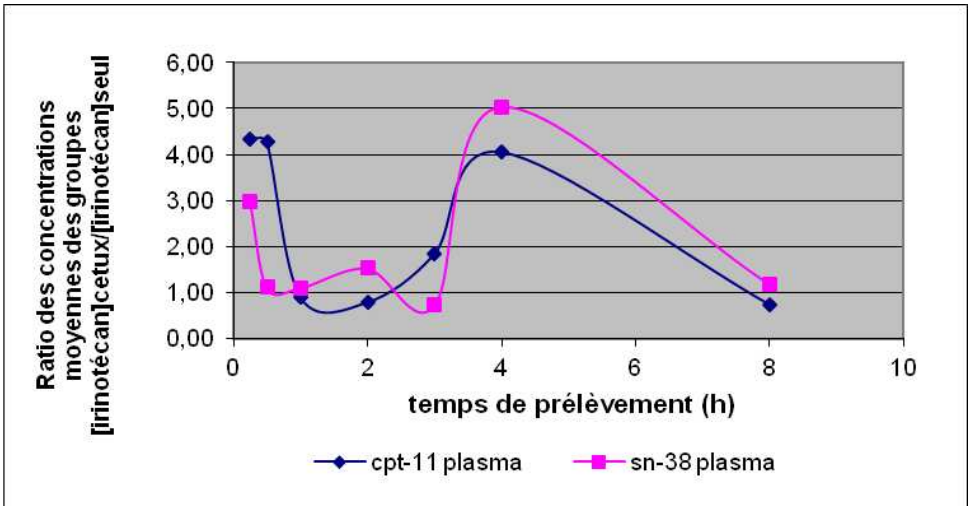


Figure 26: Représentation des ratios des concentrations plasmatiques moyennes de l'irinotécan et du SN-38 chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab

Ainsi, les ratios évoluent parallèlement (augmentation importante à 0,25 h et 4 h) pour l'irinotécan et le SN-38 dans le plasma. Une augmentation de l'exposition de l'irinotécan dans le plasma entraîne une augmentation de l'exposition plasmatique du SN-38.

Nous avons ensuite représenté ci-dessous, les ratios des concentrations de l'irinotécan (Figure 27), et, ceux du SN-38 (Figure 28) chez des souris ayant reçu le médicament seul ou avec le cétuximab, dans le plasma et la tumeur.

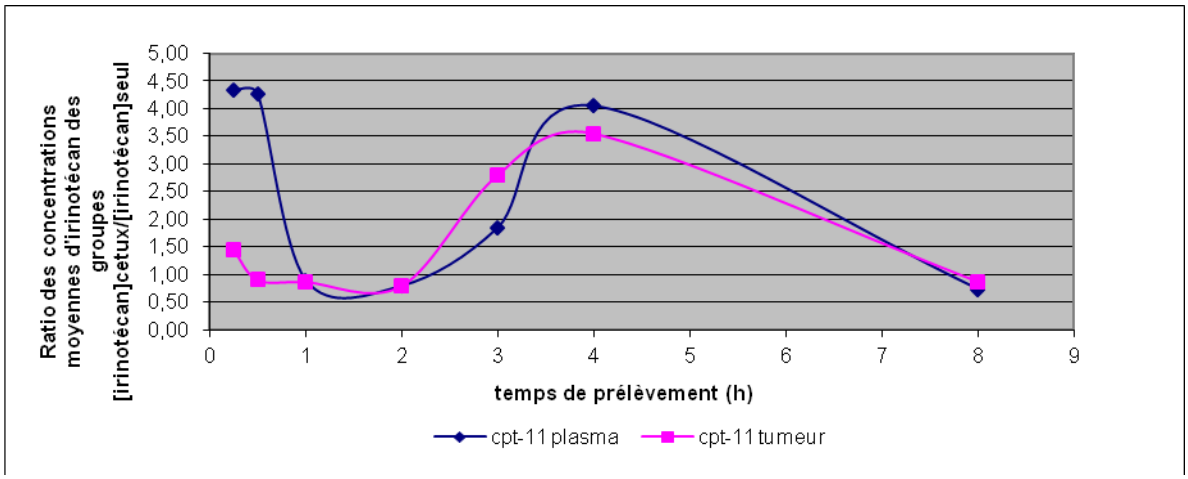


Figure 27: Représentation des ratios des concentrations de l'irinotécan chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab dans le plasma et la tumeur

On observe sur la figure 27 une évolution parallèle des ratios de concentrations d'irinotécan dans le plasma et dans la tumeur traduisant une corrélation entre les concentrations dans le plasma et la tumeur reflétant l'exposition tissulaire de l'irinotécan.

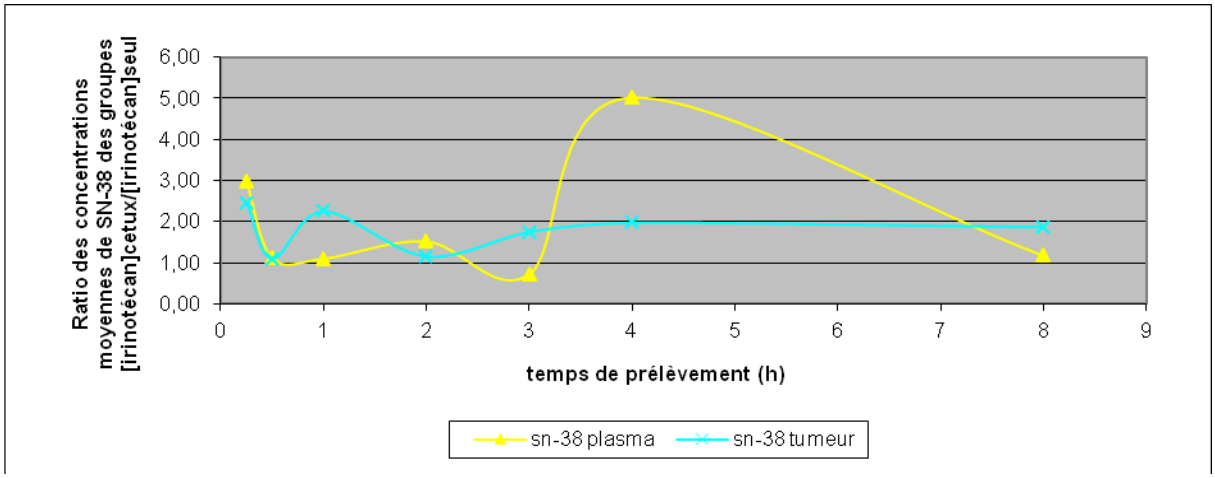


Figure 28: Représentation des ratios des concentrations du SN-38 chez des souris ayant reçu l'irinotécan seul ou avec le cétuximab dans le plasma et la tumeur

Pour le SN-38 (Figure 28), on observe des ratios au niveau du plasma importants à 0,25 et 4 h qui pourraient être à nouveau expliqués par une inhibition de l'efflux du SN-38 par le cétuximab au niveau intestinal (absorption) et biliaire (cycle entérohépatique). Les ratios de concentrations d'irinotécan dans la tumeur sont assez constants à chaque temps de prélèvement (1,1 à 2,5 avec une moyenne de 1,95) expliquant l'augmentation significative de l'AUC de SN-38 observée après un traitement par le cétuximab. L'augmentation de l'AUC du SN-38 au niveau tumoral peut être donc due à une augmentation de son AUC plasmatique, mais aussi, à une inhibition de son efflux au niveau tumoral par le cétuximab puisque les ratios de SN-38 au niveau de la tumeur restent autour de deux malgré une diminution des ratios plasmatiques.

VII. Expression de la P-gp et de la BCRP tumorale dans la xénogreffe de cancer colorectal par analyse Western Blot

Nous avons mesuré par analyse Western Blot les expressions de la P-gp et d'un deuxième transporteur d'efflux, la BCRP, dans les xénogreffes colorectales de souris contrôle (n=2 pour l'étude 1; n=2 pour l'étude 2), de souris traitées par le cétuximab puis l'irinotécan (n=3 pour l'étude 1 et 2), et de souris traitées par l'irinotécan (n=2 pour l'étude 1 et 2). Les ratios P-gp/Actine et BCRP /Actine ne sont pas significativement différents entre les 3 groupes (contrôle, cetuximab et irinotécan, irinotécan) dans chaque étude indiquant que le cétuximab et l'irinotécan n'influence pas l'expression de la P-gp et de la BCRP selon notre protocole d'administration.

		étude 1		étude 2	
	Xénogreffe	ratio X / Actine	*p*	ratio X / Actine	*p*
P-gp	CT 1	0,78		0,80	
	CT 2	0,60		0,69	
	cetux+irino 1	0,77		0,67	
	cetux+irino 2	0,40	*0,548*	0,61	*0,207*
	cetux+irino 3	0,59		0,70	
	irino seul 1	0,42		0,59	
	irino seul 2	0,80	*0,741*	0,61	*0,117*
BCRP	CT 1	1,07		0,78	
	CT 2	0,83		0,57	
	cetux+irino 1	0,88		0,57	
	cetux+irino 2	0,59	*0,937*	0,61	*0,096*
	cetux+irino 3	0,56		0,40	
	irino seul 1	0,83		0,41	
	irino seul 2	0,82	*0,267*	0,67	*0,278*

Tableau 7: Expression de la P-gp et de la BCRP dans les échantillons tumoraux de souris contrôles, traitées par l'irinotécan seul et traitées par l'irinotécan et le cétuximab

VIII. Discussion du deuxième travail

L'effet du cétuximab sur la P-gp a été testé dans un premier temps dans deux modèles cellulaires qui surexpriment la P-gp : les cellules IGROV1-DXR (surexprimant la P-gp après incubation à long terme avec de la doxorubicine) et les cellules HEK P-gp (transfectées stablement par le gène mdr). Dans un second temps, des pharmacocinétiques de l'irinotécan (administré oralement) et de son métabolite actif, le SN-38, ont été étudiées comparativement chez des souris ayant été traitées ou non par le cétuximab. Ces derniers résultats nous ont permis d'étudier l'effet de l'anticorps sur la biodisponibilité orale de l'irinotécan, et également, sur son métabolisme et son élimination au niveau plasmatique (chez la souris nude normale et porteuse d'une xénogreffe de cancer colorectal humain) et au niveau de la tumeur grâce au modèle de xénogreffe de cancer colorectal humain.

Pour évaluer l'influence du cétuximab sur la fonctionnalité de la P-gp, et par conséquent, son influence sur l'accumulation intracellulaire de médicaments substrats de la P-gp, nous avons utilisé la doxorubicine comme substrat de référence de la P-gp, sa fluorescence étant facilement mesurable par cytométrie de flux.

L'accumulation intracellulaire de doxorubicine est significativement augmentée dans les deux lignées cellulaires (IGROV1-DXR et HEK-P-gp), après incubation de ces cellules dans un milieu contenant à la fois de la doxorubicine et du cétuximab à des concentrations thérapeutiques. L'accumulation de la doxorubicine est spécifique d'une inhibition de la P-gp car elle n'est pas observée dans les cellules IGROV1-PAR traitées par le cétuximab. L'accumulation de la doxorubicine est plus importante dans les cellules HEK P-gp que dans les cellules IGROV1-DXR. Ce résultat peut être en partie expliqué par une activité supérieure de la P-gp dans les cellules IGROV1-DXR par rapport aux cellules HEK P-gp. Contrairement aux cellules HEK P-gp, les cellules IGROV1-DXR sont exposées en continue à de la doxorubicine afin de maintenir une surexpression de la P-gp dans ces cellules. Il a été démontré par Hoffmann *et al.* que la doxorubicine induit l'expression de la P-gp et augmente son activité [57]. Enfin, il est important de noter que le cétuximab, utilisé à la

concentration de 3 µM, entraîne une inhibition de la P-gp du même ordre que le vérapamil à 10 µM dans les cellules HEK P-gp. Selon des tests in vitro, une concentration de vérapamil inférieure à 11 µM est suffisante pour inhiber de 50% l'efflux de substrats spécifiques de la P-gp tels que la digoxine et la prazosine [104].

L'accumulation intracellulaire de la doxorubicine a été observée uniquement après un traitement à court terme de cétuximab (2 h) et en association avec la doxorubicine. Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse que le cétuximab inhibe l'activité de la P-gp en inhibant sa fonctionnalité. Certains médicaments peuvent inhiber l'activité de la P-gp par un autre mécanisme : en inhibant l'expression de la protéine ou en inhibant la transcription de l'ARN [105]. Ce pouvoir inhibiteur est observé *in vitro* après un traitement de quelques jours. En effet, la durée de vie moyenne étant de quelques heures pour l'ARNm et de quelques jours pour une protéine, un effet inhibiteur est visible lorsque le pool protéique est suffisamment diminué. De plus, ce type d'inhibition ne nécessite pas la présence d'un substrat de la P-gp pour être observé. Dans notre étude, il a été observé premièrement qu'un pré-traitement par le cétuximab de 24 à 72 h, effectué au préalable à l'administration de la doxorubicine, ne modifie pas l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine (parfois même la diminue). Deuxièmement, l'anticorps n'influence pas la transcription de l'ARN de la P-gp. Ces deux résultats confirment que le cétuximab n'exerce pas son effet inhibiteur de la P-gp en diminuant sa transcription ou son expression.

La diminution de la concentration d'un médicament par un inducteur de la P-gp est normalement associée à une augmentation de l'expression de la P-gp et/ou à une augmentation de sa transcription [106]. Le fait que l'anticorps n'influence pas la synthèse de la P-gp est cohérent avec un article récemment publié montrant que l'expression du gène MDR1 est faiblement exprimé dans des cellules du cancer du nasopharynx humain résistantes au cétuximab par exposition à des concentrations croissantes de l'anticorps [107]. De légères diminutions de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine ont été observées après un traitement par le cétuximab à long terme. Certains médicaments (la rifampicine, le ritonavir) peuvent être à la fois inducteur et inhibiteur des enzymes du métabolisme et transporters d'efflux [108,109]. Selon leur durée d'administration, ils peuvent être responsables de variations bi- ou tri-phasiques du profil d'élimination du

médicament avec lequel ils sont co-administrés. Ce double effet n'est pas retrouvé en clinique car un des phénomènes (inducteur ou inhibiteur) prédomine à l'état d'équilibre [108,109]. Dans notre étude, le cétuximab apparaît plus inhibiteur de la P-gp que inducteur.

L'UIC2 est un anticorps capable d'inhiber la fonctionnalité de la P-gp en se fixant sur les épitopes extracellulaires de la protéine d'efflux. Toutefois, cette inhibition est habituellement partielle, et sa mesure est variable car l'UIC2 se lie seulement à 10 à 40% des épitopes de la P-gp présents à la surface de la membrane cellulaire [101]. Il a été démontré que la réactivité de l'UIC2 avec la P-gp est augmentée lors de l'interaction entre la P-gp et des substrats tels que la vinblastine ou la ciclosporine. En utilisant le test de l'affinité de l'UIC2, nous avons montré que le cétuximab augmente l'affinité de l'UIC2 à la P-gp et donc interagit directement avec la P-gp. On peut penser que le cétuximab, pour qu'il puisse inhiber la P-gp, qu'il est nécessaire que la protéine soit dans une conformation spécifique induite par la présence d'un substrat ou d'un inhibiteur.

Les mesures de l'expression de l'EGFR montrent que les IGROV1-DXR ont un taux d'EGFR significativement supérieur par rapport aux cellules HEK P-gp. Le cétuximab, une fois fixé sur l'EGFR, est moins disponible pour inhiber la P-gp ce qui peut expliquer une diminution de l'accumulation de la doxorubicine chez les IGROV1-DXR. Toutefois, le cétuximab entraîne l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine indépendamment du statut EGFR ce qui est intéressant en clinique.

L'irinotécan et le SN-38 sont également substrats d'autres pompes d'efflux que la P-gp telles que la BCRP et la MRP. Les effets de l'anticorps sur d'autres pompes d'efflux de la famille des ATP binding cassette transporteurs n'ont pas été testés dans notre étude. Cependant, du fait que d'une part, les cellules IGROV1-DXR et IRGOV1-PAR affichent un taux similaire d'expression de la MRP1 et n'expriment pas la BCRP [95], et, que d'autre part, les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp surexpriment la P-gp, nous sommes confiants de la spécificité de nos tests vis-à-vis de la P-gp.

La deuxième partie de ce travail consistait à étudier les effets du cétuximab sur la pharmacocinétique de l'irinotécan, administré oralement, ainsi que de son métabolite actif, le SN-38.

Les premières pharmacocinétiques de l'irinotécan ont été effectuées dans le plasma de souris saines ayant reçu soit de l'irinotécan seul à 40 mg/kg, soit du cétuximab à J1 et J3 à 90 mg/kg suivi de l'irinotécan à J4 à 40 mg/kg. Les AUCs de l'irinotécan et du SN-38 sont similaires entre les deux groupes. En revanche, on observe une persistance des concentrations résiduelles jusqu'au temps 8 h pour le groupe de souris prétraité par le cétuximab et uniquement jusqu'au temps 4 h pour le groupe de souris traité par l'irinotécan seul. Ainsi, un pré-traitement de deux jours par le cétuximab semble retarder l'élimination de l'irinotécan et du SN-38.

A la suite des résultats obtenus *in vitro* et l'absence de modification des AUCs plasmatique de l'irinotécan et du SN-38 après un pré-traitement de deux jours par le cétuximab chez la souris, nous avons décidé de modifier le schéma d'administration pour les études pharmacocinétiques au niveau plasmatique et tumoral chez la souris porteuse d'une xénogreffe de cancer colorectal humain.

Ainsi, le premier groupe de souris reçoit l'irinotécan seul par voie orale à la dose de 40 mg/kg ($Irinotécan_{seul}$). Le deuxième groupe de souris reçoit du cétuximab en intra péritonéale à la dose de 90 mg/kg à J1 et J3 puis reçoit de l'irinotécan par voie orale à la dose de 40 mg/kg ($Irinotécan_{cetux}$), une heure après l'injection de cétuximab à J3. Chez l'homme, l'irinotécan est également donné une heure après l'administration de cétuximab.

Dans le groupe traité par le cétuximab, on observe d'une part, des élévations non significatives de l'AUC de l'irinotécan dans le plasma (1,3 fois) et dans la tumeur (2 fois) et d'autre part, des élévations significatives de l'AUC du SN-38 dans le plasma (1,7 fois) et dans la tumeur (1,7 fois). L'élévation de l'AUC de l'irinotécan non significative au niveau du plasma est accompagnée d'une élévation non significative au niveau de la tumeur.

L'élévation significative de l'AUC du SN-38 au niveau de la tumeur est corrélée à l'élévation significative de l'AUC du SN-38 au niveau plasma. Il peut en être déduit qu'une augmentation de l'AUC du médicament au niveau du plasma entraîne une plus grande exposition tissulaire et donc une élévation au niveau tumoral. En concomitance, le cétuximab ne modifie pas d'une manière majeure l'élimination de l'irinotécan et du SN-38.

Enfin, l'augmentation des ratios des concentrations plasmatiques de l'irinotécan et du SN-38 à deux temps de prélèvement distincts : 0,25 h et 4 h suggère que le cétuximab inhibe l'efflux de l'irinotécan et du SN-38 à la fois au niveau intestinal (à la phase d'absorption) et au niveau biliaire (au moment du cycle entéro-hépatique). De plus, pour le SN-38, les ratios au niveau de la tumeur restant autour de deux malgré une diminution des ratios plasmatiques, ce résultat pourrait être traduit par une inhibition de son efflux au niveau tumoral.

Finalement, comme l'irinotécan et le SN-38 sont substrats d'autres transporteurs d'efflux : BCRP, MRP1 et MRP2 [16,17], il est difficile d'imputer *in vivo* l'effet inhibiteur de l'anticorps uniquement sur la P-gp.

Par la technique de Western Blot, nous n'avons pas pu montrer de différence d'expression de la P-gp ni de la BCRP au niveau tumoral après traitement par le cétuximab par rapport aux souris non traitées. La technique de Western Blot permet d'étudier un éventuel effet inhibiteur du cétuximab sur l'expression de la P-gp mais pas un éventuel effet sur la fonctionnalité de la P-gp.

Une étude chez le rat a décrit une augmentation de l'AUC plasmatique de l'irinotécan, du SN-38 et du SN-38G de 2 à 4 fois après un traitement par la ciclosporine à 60 mg/kg, médicament à la fois inhibiteur de la P-gp et de la MRP2 [110]. Il a été aussi démontré dans des vésicules de canalicules biliaires de rat, l'implication de la P-gp et de la MRP2 dans l'excrétion biliaire de l'irinotécan. Le rôle de ces transporteurs diffère selon la concentration d'irinotécan présente (à 5 µM, le rôle de la P-gp est plus important ; à 250 µM, la MRP 2 a un effet majoritaire) [111]. Par conséquent, l'effet des inhibiteurs de la P-gp tels que le vérapamil ou la ciclosporine diffère avec la concentration d'irinotécan présente

dans la bile. Ainsi, les différences de résultats sur les AUCs et les concentrations résiduelles obtenues selon nos deux schémas d'administration de cétuximab peuvent être expliquées par une variation de son pouvoir inhibiteur selon les concentrations d'irinotécan présentes.

En conclusion, notre travail a montré pour la première fois que le cétuximab inhibe la P-gp *in vitro,* et entraîne une augmentation significative des AUCs plasmatiques et tumorales du SN-38 chez la souris porteuse d'une xénogreffe colorectale après une administration orale de l'irinotécan qui peut être traduite par une inhibition de l'efflux de l'irinotécan et du SN-38 au niveau intestinal et biliaire. Le mécanisme de réversion de la résistance à l'irinotécan par le cétuximab dans le cancer colorectal tel qu'il est observé en clinique peut être expliqué partiellement par nos résultats. L'effet du cétuximab sur d'autres transporteurs d'efflux et d'autres enzymes du métabolisme doit encore être étudié.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Actuellement, le traitement du cancer colorectal métastasé associe des chimiothérapies à activités diverses pour augmenter l'efficacité et surmonter la chimiorésistance. Nos travaux ont été principalement axés sur l'influence des médicaments anticancéreux sur la P-glycoprotéine. Bien qu'elle fasse déjà l'objet de nombreuses publications, la P-gp est toujours un sujet d'actualité. En étudiant deux associations de médicaments « lapatinib-evérolimus » et « cétuximab-irinotécan », nous avons pu mettre en valeur son implication dans la résistance aux traitements anti-tumoraux, même les plus récents, et, son rôle dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons montré pour la première fois que l'evérolimus est substrat de la P-gp *in vivo* grâce à des pharmacocinétiques comparées chez des souris mdr1a-/1b- et mdr1a+/1b+. Une augmentation significative de 2,6 fois de l'ASC de l'evérolimus sans un rallongement de la demi-vie d'élimination a également été démontrée chez des souris pré-traitées par le lapatinib. Ces variations de paramètres pharmacocinétiques sont caractéristiques d'une inhibition de la P-gp intestinale. L'analyse en Western Blot a confirmé une inhibition de l'expression de la P-gp intestinale chez les souris traitées par du lapatinib. Des études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé par la suite que le lapatinib est un inhibiteur de la P-gp et des CYP 450 [29,32,53]. En augmentant l'AUC de l'evérolimus de 2,6 fois dans notre étude, le lapatinib se comporterait plus comme un inhibiteur de la P-gp que des CYP450 tel que le vérapamil [112].

Nos résultats ainsi que ceux apportés par d'autres études pré-cliniques permettent d'envisager de nouvelles associations thérapeutiques chez l'homme dans le cadre du cancer colorectal et d'expliquer les toxicités liées aux interactions médicamenteuses. Des neutropénies ont été décrites lors d'une étude de phase II associant le docétaxel, un substrat de la P-gp, avec le lapatinib [113]. Cette toxicité pourrait être expliquée par une inhibition de la P-gp par le lapatinib conduisant à une diminution de l'efflux du docétaxel dans les granulocytes [113].

Notre travail montre l'importance d'effectuer des pharmacocinétiques comparées sur d'autres médicaments anticancéreux, utilisés seuls et en association, afin d'évaluer leur

caractère substrat voire inducteur ou inhibiteur de la P-gp. Des monitorings thérapeutiques pourront ainsi être proposés par la suite en milieu hospitalier pour éviter les interactions médicamenteuses. Les chimiothérapies administrées par voie orale sont principalement concernées car elles sont sujettes à l'efflux de la P-gp intestinale et sont prises d'une manière chronique.

Les études pharmacocinétiques nous ont également permis d'ouvrir des pistes sur l'étude de réversion de la résistance à l'irinotécan. Cette étude est la première à montrer qu'un anticorps monoclonal, tel que le cétuximab, augmente d'une manière significative l'AUC plasmatique et tumorale du métabolite actif de l'irinotécan, le SN-38 après administration orale de l'irinotécan. Du fait du métabolisme important de l'irinotécan au niveau intestinal, et des résultats de publications antérieures montrant une augmentation de la biodisponibilité orale de l'irinotécan suite à l'administration d'un inhibiteur de la P-gp [19-21], nous avons choisi d'administrer, dans notre étude, l'irinotécan par voie orale. Deux études pharmacocinétiques montrent que le cétuximab modifie peu les paramètres pharmacocinétiques de l'irinotécan administré par voie IV [114-115]. Les augmentations des AUCs plasmatiques de l'irinotécan (non significative) et du SN-38 (significative) observées dans cette étude chez les souris porteuses d'une xénogreffe pourraient donc être attribuées à une inhibition de l'efflux de l'irinotécan et du SN-38 au niveau intestinal. Enfin, l'augmentation de l'AUC du SN-38 au niveau tumoral peut être le résultat d'une augmentation de l'AUC du SN-38 au niveau plasmatique mais également à une inhibition de l'efflux du SN-38 directement au niveau tumoral par le cétuximab. Notre étude *in vitro* montre que le cétuximab interagit directement avec la P-gp et entraîne l'accumulation intracellulaire d'un substrat de la P-gp, la doxorubicine, dans deux modèles de cellules surexprimant la P-gp (les cellules IGROV1-DXR et HEK P-gp) indépendamment de leur statut EGFR. Le fait que cette inhibition soit indépendante de l'EGFR est une stratégie intéressante à exploiter en clinique.

L'évaluation de l'efficacité anti-tumorale et de la tolérance du lapatinib et de l'évérolimus dans un modèle de xénogreffe colorectale a montré que chacun de ces médicaments possède une activité anti-tumorale importante dans un modèle de cancer

colorectal KRAS muté résistant au cétuximab où aucun standard thérapeutique n'existe actuellement. Un traitement par l'evérolimus associé à un prétraitement par le lapatinib s'avère être une stratégie intéressante car les souris ayant reçues les deux médicaments étaient les premières à présenter des volumes tumoraux significativement plus petits par rapport au groupe contrôle (à J16 : 51% d'inhibition de la croissance tumorale est observée pour le groupe L/E contre 43% pour le groupe L et 42% pour le groupe E). Cependant, nous n'avons pas observé par la suite de différence significative entre les groupes traités bien que ces souris présentent à chaque jour de mesure les volumes tumoraux les plus faibles. Enfin, seule une toxicité hématologique modérée est observée dans les groupes traités à la fin des traitements.

La recherche du caractère substrat et/ou inhibiteur de la P-gp des nouvelles thérapies ciblées s'avère intéressante. En plus de leurs propriétés anticancéreuses, ces molécules peuvent réverser le phénomène MDR [7,8]. De plus, le caractère inhibiteur de la P-gp du cétuximab démontré dans nos travaux ouvre de nouvelles perspectives de recherche sur le rôle des anticorps monoclonaux dans le phénomène MDR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer 2002;2(1):48-58.

2- Piekarz RL, Robey RW, Zhan Z, Kayastha G, Sayah A, Abdeldaim AH, Torrico S, Bates SE. T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. Blood 2004;103(12):4636-43.

3- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84(1):265-9.

4- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist 2003;8(5):411-24.

5- Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit ? Cancer Metastasis Rev 2012 Oct 24. [Epub ahead of print]

6- Lainey E, Sébert M, Thépot S, Scoazec M, Bouteloup C, Leroy C, De Botton S, Galluzzi L, Fenaux P, Kroemer G. Erlotinib antagonizes ABC transporters in acute myeloid leukemia. Cell Cycle 2012;11(21). [Epub ahead of print]

7- Pick A, Wiese M.Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway. ChemMedChem 2012;7(4):650-62.

8- Minocha M, Khurana V, Qin B, Pal D, Mitra AK. Co-administration strategy to enhance brain accumulation of vandetanib by modulating P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediated efflux with m-TOR inhibitors.
Int J Pharm 2012;434(1-2):306-14.

9- www.theriaque.org

10- Laplante A, Demeule M, Murphy GF, Béliveau R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial PgP. Transplant Proc 2002; 34(8):3393-5.

11- Collins D, O'Connor R, O'Donovan N, Clynes M, Crown J. Lapatinib inhibits P-glycoprotein (P-GP) and synergistically enhances taxane cytotoxicity in PgP + cell lines. Annals Onc 2006;17(S8):57.

12- Gomez-Camarero J, Salcedo M, Rincon D, Lo Iacono O, Ripoll C, Hernando A, Sanz C, Clemente G, Bañares R. Use of everolimus as a rescue immunosuppressive therapy in liver transplant patients with neoplasms. Transplantation 2007;84(6):786-91.

13- Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. Clin Cancer Res 2007;15;13(14):4261-70.

14- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004;351: 337-45.

15- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 2008;359:1757-65.

16- Arimori K, Kuroki N, Hidaka M, Iwakiri T, Yamsaki K, Okumura M, Ono H, Takamura N, Kikuchi M, Nakano M. Effect of P-glycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. Pharm Res 2003;20(6):910-7.

17- http://www.pharmgkb.org/pathway/PA2001

18- Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. Ann Oncol 2002;13(12):1841-51.

19- Stewart CF, Leggas M, Schuetz JD, Panetta JC, Cheshire PJ, Peterson J, Daw N, Jenkins JJ, Gilbertson R, Germain GS, Harwood FC, Houghton P. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. Cancer Research 2004;64:7491–99.

20- Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. Eur J Pharm Sci 2009;36(4-5):580-90. Epub 2008 Dec 24.

21- Bansal T, Awasthi A, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Pre-clinical evidence for altered absorption and biliary excretion of irinotecan (CPT-11) in combination with quercetin: possible contribution of P-glycoprotein. Life Sci 2008;83(7-8):250-9. Epub 2008 Jun 22.

22- Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J, Sparreboom A, McLeod HL. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. Clin Cancer Res 2003;9(9):3246-53.

23- Kweekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. Cancer Treat Rev 2008;34(7):656-69.

24- Paule B, Castagne V, Picard V, Saffroy R, Adam R, Guettier C, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L. MDR1 polymorphism role in patients treated with cetuximab and irinotecan in irinotecan refractory colorectal cancer. Med Oncol 2010;27(4):1066-72.

25- Institut national du cancer. Epidémiologie du cancer colorectal. (2012).
Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/depistage/cancer-colorectal/dossier-pour-les-professionnels/le-cancer-colorectal

26- Haute Autorité de Santé. Guide médecin sur le cancer colorectal. (2012).
Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_644453/ald-n-30-cancer-colorectal

27- Linardini, Natalini. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. Ciência Rural 2006;36:1

28- Kovarik JM, Hartmann S, Figueiredo J, Rouilly M, Port A, Rordorf C. Effect of rifampin on apparent clearance of everolimus. Ann Pharmacother 2002;36(6):981-5.

29- Polli JW, Humphreys JE, Harmon KA, Castellino S, O'Mara MJ, Olson KL, John-Williams LS, Koch KM, Serabjit-Singh CJ. The role of efflux and uptake transporters in N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. Drug Metab Dispos 2008;36(4):695-701.

30- Soffietti R, Trevisan E, Rudà R. Targeted therapy in brain metastasis. Curr Opin Oncol. 2012;24(6):679-86.

31- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, vanDeemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(8):4028-33.

32- Molina JR, Kaufmann SC, Reid J, Rubin S, Galvez-Peralta M, Friedman R, Flatten KS, Koch KM, Gilmer TM, Mullin RJ, Jewell RC, Felten SJ, Mandrekar S, Adjei AA, Erlichman,

C. Evaluation of lapatinib and topotecan combination therapy: tissue culture, murine xenograft, and phase I clinical trial data. Clin Cancer Res 2008;14(23):7900-8.

33- Petrova DT, Nedeva P, Maslyankov S, Toshev S, Yaramov N, Atanasova S, Toncheva D, Oellerich M, von Ahsen N. No association between MDR1 (ABCB1) 2677G>T and 3435C>T polymorphism and sporadic colorectal cancer among Bulgarian patients. Cancer Res Clin Oncol 2008;134(3):317-22.

34- De Iudicibus S, De Pellegrin A, Stocco G, Bartoli F, Bussani R, Decorti G. ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. Anticancer Res 2008;28(6B):3921-8.

35- Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S, Pasz-Walczak G, Sałagacka A, Mirowski M. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 2010;25(10):1167-7.

36- Glimelius B, Garmo H, Berglund A, Fredriksson LA, Berglund M, Kohnke H, Byström P, Sørbye H, Wadelius M. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. Pharmacogenomics J 2011;11(1):61-71.

37- Côté JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Diebold MD, Soubeyran I, Thirouard AS, Selves J, Laurent-Puig P, Ychou M. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. Clin Cancer Res 2007;13(11):3269-75.

38- Bochud M, Eap CB, Bovet P, Burnier M. La génétique de l'hypertension: rôle des gènes CYP3A5 et ABCB1 dans le contrôle de la tension artérielle. Kardiovaskuläre Medizin 2008;11(11):353-60.

39- Vautier S, Fernandez C, Milane A, Lacomblez L, Davrinche C, Farinotti R. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique : implication dans les maladies neurologiques et leurs traitements. J Pharm Clin 2006;25(4) :225-35.

40- Bayet C, Fazio C, Darbour N, Berger O, Raad I, Chaboud A, Dumontet C, Guilet D. Modulation of P-glycoprotein activity by acridones and coumarins from Citrus sinensis. Phytother Res 2007;21(4):386-90.

41- El-Readi MZ, Hamdan D, Farrag N, El-Shazly A, Wink M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. Eur J Pharmacol 2010;626(2-3):139-45.

42- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J Natl Cancer Inst 1989;81(2):116-24.

43- Abolhoda, A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. Clin Cancer Res 1999;5:3352–56.

44- Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HS, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Weinstein R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: Consensus recommendations. Cancer Res 1996;56:3010–20.

45- Shukla S, Chen ZS, Ambudkar SV. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. Drug Resist Updat 2012;15(1-2):70-80.

46- Medina PJ, Goodin S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. Clin Ther 2008;30(8):1426-47.

47- Hubert P. Growth factors of the EGF family and their receptors. Bull Cancer 2007;94(7 Suppl):137-45.

48- Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med 2007;13(12):527-34.

49- Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. KRAS and colorectal cancer: an important step to the personalized medicine. IBS 2009;24:196-209.

50- Sierra JR, Cepero V, Giordano S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. Mol Cancer 2010;9:75.

51- Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette

subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2 mediated drug resistance. Cancer Res 2007;6:11012–20.

52- Yanase K, Tsukahara S, Asada S, Ishikawa E, Imai Y, Sugimoto Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. Mol Cancer Ther 2004;3(9):1119-25.

53- Dai CL, Tiwari AK, Wu CP, Su XD, Wang SR, Liu DG. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. Cancer Res 2008;68, 7905–14.

54- Yang JM, Sullivan, GF Hait, WN. Regulation of the function of P-glycoprotein by Epidermal growth factor through phospholipase C. Bioch Pharm. 1997;53(11):1597-1604.

55- Bentires-AljM, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. Oncogene 2003;22(1):90–7.

56- Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Schmitz-Salue C, Foth H, Kahl GF. Modulation of P-glycoprotein and mdr1b mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. Biochem Biophys Res Commun 1995;215(1):179-85.

57- Katrin Hoffmann, Zhi Xiao, Clemens Franz, Elvira Mohr, Susanne Serba, Markus W Büchler, Peter Schemmer. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the modulation of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. Cancer Cell Int. 2011;11: 40.

58- clinicaltrials : http://clinical trials.gov. National Institute of Health.

59- Lalloo AK, Luo FR, Guo A, Paranjpe PV, Lee SH, Vyas V, Rubin E, Sinko PJ. Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). BMC Med 2004;2:16.

60- Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, Aulds S, Crawford M, Gallagher J, Eyers T, Rivory L.The in vitro metabolism of irinotecan (CPT-11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. Br J Clin Pharmacol 2006;62(1):122-9.

61- Xu G, Zhang W, Ma MK, McLeod HL. Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan. Clin Cancer Res 2002;8(8): 2605-11.

62-Schoemaker NE, Kuppens IE, Huinink WW, Lefebvre P, Beijnen JH, Assadourian S, Sanderink GJ, Schellens JH. Phase I study of an oral formulation of irinotecan administered daily for 14 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumours. Cancer Chemother Pharmacol 2005;55(3):263-70.

63- Soepenberg O, Dumez H, Verweij J, Semiond D, deJonge MJ, Eskens FA, ter Steeg J, Selleslach J, Assadourian S, Sanderink GJ, Sparreboom A, van Oosterom AT. Phase I and pharmacokinetic study of oral irinotecan given once daily for 5 days every 3 weeks in combination with capecitabine in patients with solid tumors. J Clin Oncol 2005;23(4), 889-98.

64- Herben VM, Ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors. Pharm World Sci 1998;20(4):161-172.

65- Van der Bol JM, Loos WJ, de Jong FA, van Meerten E, Konings IR, Lam MH, de Bruijn P, Wiemer EA, Verweij J, Mathijssen RH. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics and toxicities of irinotecan in cancer patients: a prospective cross-over drug-drug interaction study. Eur J Cancer 2011;47(6): 831-8.

66- Van der Bol JM, Visser TJ, Loos WJ, de Jong FA, Wiemer EA, van Aken MO, Planting AS, Schellens JH, Verweij J, Mathijssen RH. Effects of methimazole on the elimination of irinotecan. Cancer Chemother Pharmacol 2011;67(1):231-236

67- Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. Toxicol In Vitro 2006;20(2):163-75

68- Xu C, Wang X, Staudinger JL. Regulation of tissue-specific carboxylesterase expression by pregnane x receptor and constitutive androstane receptor. Drug Metab Dispos 2009;37(7):1539-47.

69- Chester JD, Joel SP, Cheeseman SL, Hall GD, Braun MS, Perry J, Davis T, Button CJ, Seymour MT. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral

ciclosporin in patients with fuorouracil-refractory metastatic colon cancer. J Clin Oncol 2003;21(6):1125-32.

70- Arnoletti JP, Buchsbaum DJ, Huang ZQ, Hawkins AE, Khazaeli MB, Kraus MH, Vickers SM. Mechanisms of resistance to Erbitux (anti-epidermal growth factor receptor) combination therapy in pancreatic adenocarcinoma cells. J Gastrointest Surg 2004;8:960-9.

71- Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nat Rev Cancer 2001;1:118-29.

72- Luo FR, Yang Z, Dong H, Camuso A, McGlinchey K, Fager K, Flefleh C, Kan D, Inigo I, Castaneda S, Rose WC, Kramer RA,Wild R, Lee FY. Correlation of pharmacokinetics with the antitumor activity of Cetuximab in nude mice bearing the GEO human colon carcinoma xenograft. Cancer Chemother Pharmacol. 2005;56(5):455-64.

73- O'Reilly T, McSheehy PM. Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals Transl Oncol 2010;3(2):65-79.

74- Pallet N, Beaune P, Thervet E, Legendre C, Anglicheau D. inhibiteurs de mTOR Des antiprolifératifs pléiotropiques. Medecine Science 2006;22:947-52.

75- Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. Oncogene 2011;29(26):3733-44.

76- O'Reilly T, McSheehy PM, Kawai R, Kretz O, McMahon L, Brueggen J, Bruelisauer A, Gschwind HP, Allegrini PR, Lane HA. Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. Cancer Chemother Pharmacol 2010;65(4):625-39.

77- Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. Drug Metab Dispos 1999 ;27(5):627-32.

78- Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. Clin Pharmacokinet 2004;43(2):83-95.

79- Kovarik JM, Beyer D, Schmouder RL. Everolimus drug interactions: application of a classification system for clinical decision making. Biopharm Drug Dispos 2005;27(9):421-6.

80- O'Donnell A, Faivre S, Burris HA 3rd, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, Lane HA, Hazell K, Zoellner U, Kovarik JM,Brock C, Jones S, Raymond E, Judson I. Phase I

pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. J Clin Oncol. 2008;26(10):1588-95.

81- Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. 2008;26(10):1603-10.

82- Medina PJ, Goodin S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. Clin Ther 2008;30(8):1426-47.

83- Koch KM, Reddy NJ, Cohen RB, Lewis NL, Whitehead B, Mackay K, Stead A, Beelen AP, Lewis LD. Effects of food on the relative bioavailability of lapatinib in cancer patients. J Clin Oncol 2009;27(8):1191-6.

84- Hoban CJ, Hoering A, Synold TW, Chung V, Gandara DR, Schott AF, Kingsbury L, Lew D, LoRusso PM, Gadgeel SM. Phase I evaluation of lapatinib and everolimus in patients with advanced malignancies: Southwest Oncology Group trial S0528. J Clin Oncol 27:15s, 2009 (suppl; abstr 3553).

85- Schellens JH, Malingré MM, Kruijtzer CM, Bardelmeijer HA, van Tellingen O, Schinkel AH, Beijnen JH. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. Eur J Pharm Sci 2000;12(2):103-10.

86- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 1994;77(4):491-502.

87- Kwei GY, Alvaro RF, Chen Q, Jenkins HJ, Hop CE, Keohane CA, Ly VT, Strauss JR, Wang RW, Wang Z, Pippert TR,Umbenhauer DR. Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein Drug Metab Dispos 1999;27(5):581-7.

88- Taketo MM, Edelmann W. Mouse models of colon cancer. Gastroenterology 2009;136(3):780-98.

89-Liui C, Li W, Li B, Huang W, Yang H, Lou B. Establishment of human primary colorectal tumor xenograft models to test anticancer drugs. J Clin Oncol 2010;28suppl; abstr e14121

90- Vrignaud P. Preclinical models in oncology. Bull Cancer. 2011;98(11):1355-61.

91- Majewski M, Korecka M, Joergensen J, Fields L, Kossev P, Schuler W, Shaw L, Wasik MA. Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses. Transplantation 2003;27:75(10):1710-7

92- Zhou Y, Li S, Hu YP, Wang J, Hauser J, Conway AN, Vinci MA, Humphrey L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG. Blockade of EGFR and ErbB2 by the novel dual EGFR and ErbB2 tyrosine kinase inhibitor GW572016 sensitizes human colon carcinoma GEO cells to apoptosis. Cancer Res 2006;66(1):404-11.

93- Bonhomme-Faivre L, Benyamina A, Reynaud M, Farinotti R, Abbara C. Disposition of Delta(9)tetrahydrocannabinol in CF1mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. AddictBiol 2008;13:295–300.

94- Kovarik JM, Beyer D, Schmouder RL. Everolimus Drug Interactions: Application of a Classification System for Clinical Decision Making. Biopharm Drug Dispos 2006;27(9):421-6.

95- Jovelet C, Bénard J, Forestier F, Farinotti R, Bidart JM, Gil S. Inhibition of P-glycoprotein functionality by vandetanib may reverse cancer cell resistance to doxorubicin. Eur J Pharm Sci 2012;46(5):484-91.

96- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55.

97- Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH, Yeap BY, Kobayashi S, Lindeman N, Halmos B, Pearlberg J, Tsuchihashi Z,Cantley LC, Tenen DG, Johnson BE, Jänne PA. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lungcancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. J Natl Cancer Inst. 2005;97(16):1185-94.

98- Wei W, Guo RP, Li JQ, Xu L, Shi M, Zhang YQ. Effects of cetuximab combined erlotinib on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Bel-7402 Ai Zheng 2008;27(4):386-92.

99- Goda K, Nagy H, Mechetner E, Cianfriglia M, Szabó G Jr. Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells. Eur J Biochem 2002;269(11):2672-7.

100- Nagy H, Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Szilasi M, Kappelmayer J, Lustyik G, Cianfriglia M, Szabó G Jr. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. Biochem Biophys Res Commun 2004;315(4):942-9.

101- Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Nagy H, Márián T, Megyeri A, Krasznai Z, Juhász I, Vecsernyés M, Szabó G Jr. Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. J Pharmacol Exp Ther 2007;320(1):81-8.

102- Stewart CF, Zamboni WC, Crom WR, Houghton PJ. Disposition of irinotecan and SN-38 following oral and intravenous irinotecan dosing in mice. BMC Cancer. 2010;10:255.

103- Monographie de l'Erbitux. (2010).

Disponible sur: http://www.bmscanada.ca/static/products/fr/pm_pdf/Erbitux_FR_PM.pdf.

104- Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, Balakrishnan A, Keogh JP, Kunta JR, Serabjit-Singh CJ, Polli JW. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. Drug Metab Dispos 2006;34(5):786-92.

105- Zrieki A, Farinotti R, Buyse M. Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line. Pharm Res 2008;25(9):1991-2001.

106- Levêque D, Lemachatti J, Nivoix Y, Coliat P, Santucci R, Ubeaud-Séquier G. Mechanisms of pharmacokinetic drug-drug interactions. Rev Med Interne 2010;31(2) :170-9.

107- Zuo Q, Luo RC. Relationship between the insulin-like growth factor 1 receptor signaling pathway and the resistance of nasopharyngeal carcinoma to cetuximab. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2010;8:575-9.

108- van Giersbergen PL, Treiber A, Schneiter R, Dietrich H, Dingemanse J. Inhibitory and inductive effects of rifampin on the pharmacokinetics of bosentan in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther 2007;81(3):414-9.

109- Kharasch ED, Bedynek PS, Walker A, Whittington D, Hoffer C. Mechanism of ritonavir changes in methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics: II. Ritonavir effects on CYP3A and P-glycoprotein activities. Clin Pharmacol Ther 2008;84(4) :506-12.

110- Mathijssen RH, Van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 2001;7(8):2182-94.

111- Chu XY, Kato Y, Sugiyama Y. Possible involvement of P-glycoprotein in biliary excretion of CPT-11 in rats. Drug Metab Dispos 1999;27(4):440-1.

112- Kovarik JM, Beyer D, Schmouder RL. Everolimus Drug Interactions: Application of a Classification System for Clinical Decision Making. Biopharm Drug Dispos 2006;27:421-6.

113- Bonnefoi H, Zaman K, Debled M, Fiche M, Fournier M, Nobahar M, Pierga JY, Koch KM, Bartlett J, Zimmer A, Marreaud S, Bogaerts J, Cameron D. An European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase I study of lapatinib and docetaxel as neoadjuvant treatment for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) positive locally-advanced/inflammatory or large operable breast cancer. Eur J Cancer. 2012 Sep 18. [Epub ahead of print]

114- Czejka M, Gruenberger B, Kiss A, Farkouh A, Schueller J. Pharmacokinetics of irinotecan in combination with biweekly cetuximab in patients with advanced colorectal cancer. Anticancer Res 2010;30(6):2355-60.

115- Delbado C, Pierga JY, Dieras V, Faivre S, Laurence V, Vedovato JC, Bonnay M, Mueser M, Nolting A, Kovar A, Raymond E. Pharmacokinetic profile of cetuximab (Erbitux) alone and in combination with irinotecan in patients with advanced EGFR-positive adenocarcinoma. Eur J Cancer 2005;41(12) :1739-45.

Etude de l'effet sur la P-glycoprotéine (ABCB1) de deux médicaments dirigés contre le récepteur de facteur de croissance épithélial (EGFR), le cétuximab et le lapatinib et conséquence sur la pharmacocinétique et l'efficacité anti-tumorale de médicaments substrats de ABCB1 chez la souris

Résumé:

La P-glycoprotéine (P-gp) est une protéine transmembranaire de la famille des ATP binding cassette transporteurs. Elle est impliquée dans l'efflux du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire d'une grande variété de médicaments anticancéreux. Elle peut être responsable de la diminution de la biodisponibilité orale et de la concentration intra-tumorale des médicaments qui en sont substrats. Elle peut notamment être surexprimée par les cellules cancéreuses des adénocarcinomes du colon naïfs de tout traitement, suggérant une résistance naturelle de cette tumeur et également après une chimiothérapie.

Notre premier travail *in vivo* a documenté le caractère substrat de la P-gp de l'évérolimus, inhibiteur de mTOR indiqué dans divers cancers (rein, tumeurs neuroendocrines d'oringine pancréatique et sein), jusqu'à maintenant uniquement étudié dans des modèles *in vitro*. Une augmentation significative de l'AUC de l'évérolimus administré par voie orale est observée chez des souris mdr1a-/b- comparées à des souris mdr1a+/1b+. Une amélioration significative de la biodisponibilité orale de l'évérolimus est aussi notée chez des souris prétraitées par le lapatinib (Tyverb®), inhibiteur des tyrosines kinases (EGFR et HER2) indiqué dans le cancer du sein, par rapport aux souris ayant reçues l'évérolimus seul. Ce résultat est accompagné d'une inhibition de l'expression de la P-gp intestinale par le lapatinib mesurée par la technique de Western Blot. Enfin, une étude préclinique menée chez des souris porteuses d'une xénogreffe colorectale mutée KRAS montre une activité anti-tumorale certaine des deux médicaments utilisés seuls et en schéma séquentiel.

Notre seconde étude a montré pour la première fois que le cétuximab (Erbitux®), anticorps anti-EGFR, inhibe la fonctionnalité de la P-gp dans deux lignées cellulaires surexprimant la P-gp (les cellules IGROV-1 et les HEK P-gp) indépendamment de leur statut EGFR et entraîne chez des souris porteuses d'une xénogreffe colorectale une augmentation significative de la biodisponibilité orale et de la concentration intra-tumorale du SN-38, métabolite actif de l'irinotécan (Campto®) administré par voie orale. Le cétuximab étant prescrit en association avec l'irinotécan chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastasé, initialement réfractaire à l'irinotécan, ces résultats pourraient en partie expliquer la réversion de la résistance à l'irinotécan par le cétuximab par une inhibition de l'efflux de la P-gp.

Grâce à l'étude de deux associations de médicaments «lapatinib-evérolimus» et «cétuximab-irinotécan», nous avons démontré l'intérêt de l'étude de l'inhibition de la P-gp avec les traitements les plus récents, notamment son rôle dans l'amélioration de la biodisponibilité orale de chimiothérapies utilisées par voie orale.

Mots clés: evérolimus, lapatinib, cétuximab, irinotécan, P-glycoprotéine, xénogreffe colororectale

Laboratoire d'accueil
EA4123 " Laboratoire de Pharmacie Clinique "
Université Paris-Sud XI
Faculté de Pharmacie – Tour D1 – 5ème étage
5, rue J.B. Clément – 92290 CHATENAY-MALABRY*