



HAL
open science

**Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du
carboplatine et étude
pharmacocinétique-pharmacogénétique de l'étoposide
dans le cadre d'un essai clinique de phase II
d'intensification thérapeutique en cancérologie**

Sotheara Moeung

► **To cite this version:**

Sotheara Moeung. Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du carboplatine et étude pharmacocinétique-pharmacogénétique de l'étoposide dans le cadre d'un essai clinique de phase II d'intensification thérapeutique en cancérologie. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30146 . tel-02301589

HAL Id: tel-02301589

<https://theses.hal.science/tel-02301589>

Submitted on 30 Sep 2019

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du **DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Sotheara MOEUNG

Le 16 octobre 2018

**Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du
carboplatine et étude
pharmacocinétique/pharmacogénétique de l'étoposide
dans le cadre d'un essai clinique de phase II
d'intensification thérapeutique en cancérologie**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Pr. Etienne CHATELUT et Dr. Fabienne THOMAS

Jury

Pr. Sylvain LADOIRE, Rapporteur
Pr. Franck SAINT-MARCOUX, Rapporteur
Pr. Françoise NEPVEU, Examineur
Dr. Fabienne THOMAS, Co-directeur de thèse
Dr. Christine CHEVREAU, Membre invité
Pr. Jean CROS, Membre invité



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Sotheara MOEUNG

Le 16 octobre 2018

**Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du
carboplatine et étude
pharmacocinétique/pharmacogénétique de l'étoposide
dans le cadre d'un essai clinique de phase II
d'intensification thérapeutique en cancérologie**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Pr. Etienne CHATELUT et Dr. Fabienne THOMAS

Jury

Pr. Sylvain LADOIRE, Rapporteur
Pr. Franck SAINT-MARCOUX, Rapporteur
Pr. Françoise NEPVEU, Examineur
Dr. Fabienne THOMAS, Co-directeur de thèse
Dr. Christine CHEVREAU, Membre invité
Pr. Jean CROS, Membre invité

« Existe-t-il pour l'Homme un bien plus précieux que la santé? »
Socrate (470 – 399 avant J-C)

Remerciements

A Monsieur le Professeur Franck SAINT-MARCOUX,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'être rapporteur de thèse. C'est également un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici la marque de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Sylvain LADOIRE,

Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse en tant que rapporteur. C'est également un honneur pour moi de vous avoir parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Madame la Professeur Françoise NEPVEU,

Je vous adresse mes remerciements pour votre gentillesse d'avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean CROS

Sans votre soutien, je n'aurais pas pu réaliser ce travail de thèse. Je vous remercie également pour votre contribution importante au développement de l'enseignement et de la formation des pharmaciens au Cambodge. C'est un honneur pour moi de vous avoir parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Christine CHEVREAU,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et de m'avoir permis de travailler sur l'étude TICE dont vous êtes l'investigateur principal. Ce fut pour moi très formateur de travailler sur ces données.

A Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU,

Je vous suis très reconnaissant et vous remercie pour avoir accepté d'être membre de mon comité de thèse.

A Monsieur le Professeur Jérôme GUITTON,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de mon comité de thèse.

A mon Directeur de thèse, Monsieur le Professeur Etienne CHATELUT,

Je tiens à vous remercier infiniment Monsieur! D'abord, pour m'avoir accepté au sein de votre laboratoire de pharmacologie afin d'effectuer cette thèse et ensuite d'avoir fait en sorte que mes travaux se déroulent dans les meilleures conditions. Je suis toujours stupéfait (et je suis sûr que je ne suis pas le seul) par votre forte capacité d'analyse, votre rapidité de réflexion et de votre recul sur la pharmacocinétique. J'espère vivement atteindre, un jour, un tel niveau.

A ma co-directrice de thèse, Madame le Docteur Fabienne THOMAS,

Je te suis très reconnaissant, Fabienne, d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Je te remercie également pour les nombreux conseils très pertinents ainsi que le temps que tu m'as consacré pour que je puisse avancer dans mes analyses. Tu étais toujours prête pour une discussion sur les problèmes que j'ai rencontrés lors des analyses malgré ton emploi du temps très chargé.

A la Fondation Pierre Fabre,

J'adresse mes remerciements à la Fondation Pierre Fabre pour le financement de ma thèse et pour son implication dans la formation des pharmaciens au Cambodge. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A l'AEPK (Amicale des Etudiants en pharmacie et des Pharmaciens Khmers),

Je ne saurais manquer de remercier l'AEPK qui s'implique activement dans l'enseignement et la formation des enseignants à la Faculté de Pharmacie de Phnom Penh. Il est indéniable que votre soutien a un impact significatif sur le développement du Cambodge. Veuillez trouver ici la marque de ma profonde gratitude.

A Monsieur Hot BUN,

Je tiens à vous remercier, Lork Krou, pour vos conseils qui m'ont guidé dans le choix de mon parcours académique et, surtout, pour les efforts que vous avez consacrés à l'enseignement et la formation des enseignants à la Faculté de Pharmacie de Phnom Penh.

A Monsieur Sothea KIM,

Je vous remercie, Lork Krou, pour tous vos conseils concernant le choix de ma future carrière.

A mes enseignants de la Faculté de Pharmacie à Phnom Penh et du Master Mékong Pharma, pour m'avoir transféré les connaissances et compétences nécessaires afin que je puisse réaliser ce travail de thèse.

A Florence DELCHER, pour m'avoir aidé à postuler pour le stage de M2 en France et à surmonter les premières démarches administratives.

A Sylvie MONFERRAN, pour les repas et les conversations que l'on a eus ensemble mais surtout d'être comme un membre de ma famille.

A Thierry LAFONT et Isabelle LOCHON, pour m'avoir formé à utiliser le SAA. Thierry ! Tu te souviens de la surprise que nous a faite le SAA lors du premier jour de la formation? (Il a failli prendre feu!!!).

A Sabrina MARSILI, pour avoir effectué une grande partie des dosages de l'étoposide.

A Christelle VACHOUX, pour m'avoir invité chez toi. C'étaient des moments agréables !

A Caroline DELMAS, pour m'avoir formé à réaliser les manip génétiques.

A Mélanie WHITE-KONING, pour m'avoir aidé avec des problèmes de stats et corrigé mon anglais dans les manuscrits.

A Ben ALLAL, pour parler anglais avec moi tous les jours et surtout pour m'avoir aidé à rédiger la lettre pour demander un rendez-vous d'urgence à la préfecture pour avoir un duplicata de ma carte de séjour perdue.

A Marie-Noëlle PALUDETTO, pour avoir été la référente pour les indications thérapeutiques du carboplatine et de l'étoposide.

A Eleanor FORSTER et Maï DUONG, pour avoir participé à la réalisation des manip génétiques.

A Yohan GALLOIS, pour avoir interprété les audiogrammes et mis en forme les données audiométriques.

A toute l'équipe 14,

Quelle belle équipe!!

Un grand merci à Cécile ARELLANO, aux anciens doctorants, internes, externes, stagiaires (Loïc FIEVET, Diane-Charlotte IMBS, Félicien LE LOUEDEC, Caroline PROTIN, Chloé LAPLAGNE, Camille CHAUBET, Becky GRAHAM...) et surtout les actuels (Alicja PUSZKIEL, Maud MAILLARD, Marie-Noëlle PALUDETTO, Fanny GALLAIS, Marine SIRVENT, Alejandro CASTILLO, Lorraine QUILLIEN, Sandra PORTES, Dalil BOULEFAA, Malika HAMDANI)... pour votre accueil et votre esprit d'équipe qui ont rendu mes trois ans et 6 mois au labo un des meilleurs moments de ma vie.

Merci à tous **les investigateurs, les biologistes, les IDE, les ARC, les techniciens et les patients** qui ont participé à l'étude TICE et sans qui ces remerciements n'auraient pas lieu d'être.

ជូនចំពោះអ្នកម៉ាកនិងលោកប៉ា (A mes parents),

កូនសូមអរគុណម៉ាកប៉ាដែលបានអប់រំណែនាំនិងលើកទឹកចិត្តកូនអោយប្រឹងប្រែងរៀនសូត្ររហូតមកដល់ពេលនេះ។ កូនចាំមិនភ្លេចទេពាក្យដែលម៉ាកប៉ាតែងប្រាប់កូនថា « បើកូនចង់ស្រឡាតខ្លួន ត្រូវខំរៀន » ។ សូមអោយប៉ាម៉ាកមានសុខភាពល្អ អាយុយឺនយូរ នៅថែទាំកូនចៅបានយូរអង្វែងទៅមុខទៀត។

A François HENRIC, pour avoir la gentillesse de t'occuper aussi bien de nous, les étudiants cambodgiens à Toulouse, et surtout pour nous avoir fait découvrir différents endroits magnifiques pendant ces trois dernières années.

A tous mes amis du Cambodge et ceux que j'ai rencontrés à Toulouse, pour être toujours à mes côtés et pour tous les bons moments que nous avons eus ensemble.

Table des matières

Introduction	12
Revue bibliographique	14
I. INDIVIDUALISATION DE DOSES DES MEDICAMENTS CYTOTOXIQUES	14
I.A. Rationnel	14
I.B. Méthode conventionnelle	15
I.C. Adaptation <i>a priori</i> de dose basée sur les caractéristiques des patients	16
I.D. Méthode de dose-test	17
I.E. Suivi thérapeutique pharmacologique (TDM)	17
I.E.1. Contraintes à la réalisation du TDM des cytotoxiques	17
a). <i>Difficulté d'établir l'intervalle thérapeutique cible</i>	17
b). <i>Difficulté analytique</i>	18
c). <i>Schéma d'administration particulier</i>	18
I.E.2. Stratégie de prélèvements limités pour l'estimation de l'AUC	19
a). <i>Régression linéaire multiple</i>	19
b). <i>Pharmacocinétique de population et analyse bayésienne</i>	20
II. PRINCIPE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION ET ANALYSE BAYESIENNE	21
II.A. Approches en deux étapes	21
II.B. Modélisation non linéaire à effets mixtes	21
II.B.1. Modèle de structure.....	22
II.B.2. Modèles statistiques	24
a). <i>Variabilité interindividuelle</i>	25
b). <i>Variabilité résiduelle</i>	26
c). <i>Variabilité inter-occasion (IOV)</i>	28
II.B.3. Modèle de covariables	28
II.B.4. Expression générale du modèle.....	31

II.C. Estimation bayésienne des paramètres individuels	32
II.D. Evaluation d'un modèle.....	34
II.D.1. Evaluation graphique	34
II.D.2. Précision des paramètres	35
II.D.3. « Bootstrap »	35
II.D.4. « Visual Predictive check »	36
III. GENERALITES SUR LE CARBOPLATINE	37
III.A. Présentation	37
III.B. Structure chimique et activité pharmacologique.....	37
III.C. Mécanisme d'action cytotoxique.....	38
III.D. Propriétés pharmacocinétiques	40
III.E. Méthodes analytiques appliquées en pharmacocinétique.....	40
III.F. Individualisation de doses	42
III.G. Indications.....	46
IV. GENERALITES SUR L'ETOPOSIDE	50
IV.A. Présentation.....	50
IV.B. Structure	50
IV.C. Mécanisme d'action cytotoxique	51
IV.D. Propriétés pharmacocinétiques.....	52
IV.E. Méthodes analytiques appliquées en pharmacocinétique	54
IV.F. Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique	54
IV.G. Individualisation de doses	56
IV.H. Indications.....	58
Travaux personnels.....	61
Objectifs.....	61
I. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES DU CARBOPLATINE	64
I.A. Apport du TDM dans la maîtrise de l'AUC du carboplatine.....	64
I.A.1. Article n°1	64

I.B. Estimation de la clairance ultrafiltrable à partir des concentrations plasmatiques totales ...	78
I.B.1. Article n°2	78
I.C. Résultats complémentaires	102
I.C.1. Evaluation prospective de l'équation de régression linéaire aux cycles 2 et 3	102
I.C.2. Comparaison entre différentes méthodes d'adaptation de doses	103
I.C.3. Bénéfice du TDM sur la réponse et la toxicité du protocole TICE	104
I.D. Discussion	105
II. ANALYSE PHARMACOGENETIQUE DE L'OTOTOXICITE DU CARBOPLATINE	108
II.A. Introduction	108
II.B. Matériels et méthodes	115
II.B.1. Détermination du génotype des patients	115
II.B.2. Evaluation auditive et définition des paramètres auditifs	117
II.B.3. Analyses statistiques	118
II.C. Résultats	119
II.C.1. Description de l'évaluation auditive	119
II.C.2. Analyses statistiques	122
II.D. Discussion	125
III. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES ET PHARMACOGENETIQUES DE L'ETOPOSIDE ..	130
III.A. Article n° 3	130
III.B. Discussion	152
Conclusion générale et perspectives	154
Références bibliographiques	156
Annexe 1	174
Annexe 2	175
Annexe 3	177

Liste des abréviations

ABCC2 : *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2*
ABCC3 : *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 3*
ACYP2 : *Acylphosphatase 2*
ALAT : *Alanine transaminase*
ALB : *Blood albumin*, albuminémie
APL : *Alkaline phosphatase*
ASAT : *Aspartate transaminase*
ATP7A : *ATPase Copper Transporting Alpha*
ATP7B : *ATPase copper transporting Beta*
AUC : *Area Under the Curve*, aire sous la courbe
BILI : *Total bilirubin*
bp : *Base pair*, paire de bases
BSA : *Body Surface Area*, surface corporelle
BW : *Body Weight*, poids
CL : Clairance
CL_{PL} : Clairance plasmatique totale
CL_{UF} : Clairance (de platine) ultrafiltrable
COMT : *Catéchol-O-méthyltransférase*
C_{SS} : *Steady state concentration*, concentration à l'état d'équilibre
CTCAE : *Common Terminology Criteria for Adverse Events*
CTR1 : *Copper Transporter 1*
CV : Coefficient de Variation
CysC : *Serum cystatin C*
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DV : *Dependent Variable*, variable dépendante
EBE : *Empirical Bayes Estimate*
GFR : *Glomerular Filtration Rate*, débit de filtration glomérulaire
GGT : *Gamma-Glutamyl Transpeptidase*
GSTT1 : *Glutathion-S-Transférase Thêta 1*
IOV : *Inter-Occasion variability*, variabilité inter-occasion

IPRED : *Individual Predictions*, prédictions individuelles

IV : Intraveineux

IWRES : *Individual Weighted Residual*, résiduelle individuelle pondérée

LDH : *Lactate dehydrogenase*

LRP2 : *Low-density lipoprotein-Related Protein 2*

MAPE : *Mean Absolute Percentage Error*, pourcentage d'erreur absolu moyen

Max : *Maximum*

Min : *Minimum*

MPE : *Mean Percentage Error*, pourcentage d'erreur moyen

MRP2 : *Multidrug Resistant associated Protein 2*

NONMEM : *Nonlinear Mixed-Effects Modeling*, modélisation non linéaire à effets mixtes

NR112 : *Nuclear Receptor subfamily 1 group 1 member 2*

OCT2 : *Organic Cation Transporter 2*

OFV : *Objective Function Value*, valeur de la fonction objective

Pej : Pourcentage d'erreur de l'individu « j »

P-gp : *P-glycoprotein*

PK : Pharmacocinétique

PK-pop : Pharmacocinétique de population

PL : Plasmatique totale

PRED : *Population Predictions*, prédictions de population

PROT : *Total serum protein*, protéines totales

PTA4 : *Pure Tone Audiometry at 4000Hz*

PXR : *Pregnane X Receptor*

ROS : *Reactive Oxygen Species*, espèces réactives de l'oxygène

Scr : *Serum creatinine*, créatininémie

SE : *Standard Error*, erreur standard

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*, polymorphisme mononucléotidique

TDM : *Therapeutic Drug Monitoring*, Suivi Thérapeutique Pharmacologique

TPMT : Thiopurine S-méthyltransférase

TV : *Typical Value*, valeur typique

UF : Ultrafiltrable

WRES : *Weighted residual*, résiduelle pondérée

XPC : *Xeroderma Pigmentosum, Complementation group C*

Figures

Figure 1. Exemple de modèle mamillaire.....	23
Figure 2. Exemple d'un modèle à un compartiment.....	24
Figure 3. Schéma représentant la variabilité interindividuelle (à gauche) et résiduelle (à droite) du modèle non linéaire à effets mixtes.....	25
Figure 4. Graphique représentant des données avec une variance constante (à gauche) ou un coefficient de variation constant (à droite).....	27
Figure 5. Effet des covariables sur la variabilité pharmacocinétique.....	29
Figure 6. "Visual Predictive Check ou VPC".....	36
Figure 7. Structure chimique du cisplatine (A), carboplatine (B) et leur métabolite actif «diaquaplatine» (C).....	38
Figure 8. Structure des différents adduits de platine.....	39
Figure 9. Différentes étapes pour obtenir le platine ultrafiltrable.....	42
Figure 10. La podophyllotoxine (a) et son dérivé semi-synthétique, etoposide (b).....	51
Figure 11. Le transport et le métabolisme de l'étoposide.....	53
Figure 12. Box plot de pourcentage d'erreurs (%PE) entre la dose idéale et la dose obtenue à chaque cycle par différentes méthodes.....	103
Figure 13. Mécanisme de l'ototoxicité du cisplatine.....	108
Figure 14. Role du système d'homéostasie du cuivre dans le transport et l'efflux des dérivés de platine.....	113
Figure 15. Electrophorèse suite à la PCR multiplexe de GSTT1 sur gel d'agarose à 2%.....	116
Figure 16. Effectifs de patients pour les différentes analyses.....	119
Figure 17. Evaluation de la sévérité de la toxicité auditive induite par le carboplatine haute dose.....	120
Figure 18. Seuil auditif moyen des 2 oreilles (en dB) aux différentes fréquences en pré- (n=37) et post-carbo (n=47).....	120

Tableaux

<i>Tableau 1. Evaluation prospective de la méthode d'estimation de la CL_{UF} à partir des concentrations plasmatiques totales par l'équation $CL_{UF}=1,15 CL_{PL} + 0,13$ chez les patients TICE aux cycles 2 et 3.....</i>	<i>102</i>
<i>Tableau 2. Polymorphismes génétiques décrits pour leur implication dans l'ototoxicité du cisplatine et sélectionnés pour cette étude.....</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 3. Méthodes de génotypage pour les polymorphismes génétiques étudiés.....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 4. Données audiométriques des patients évaluables de l'étude TICE.....</i>	<i>121</i>
<i>Tableau 5. Association entre les polymorphismes génétiques et la variation pré/post-carbo de différents paramètres auditifs.....</i>	<i>123</i>
<i>Tableau 6. Association entre les polymorphismes génétiques et l'état auditif en post-carbo.</i>	<i>124</i>

Introduction

L'intensification de doses de la chimiothérapie a été introduite pendant les années 1980 comme un moyen de contourner le phénomène de résistance. Avec support de cellules souches hématopoïétiques, les chimiothérapies à haute dose sont, actuellement, indiquées dans un certain nombre de cancers tels que le cancer métastatique du sein, les tumeurs germinales en rechute et le lymphome non Hodgkinien agressif à lymphocyte B. En cancérologie, cette intensification thérapeutique repose sur le principe que des doses plus élevées de ces anticancéreux augmentent leur effet cytotoxique sur les cellules tumorales, et donc améliorent les réponses au traitement. Cependant, ces molécules extrêmement toxiques sont caractérisées par une marge thérapeutique très étroite et une forte variabilité pharmacocinétique (PK) interindividuelle. Par conséquent, lorsque ces protocoles de hautes doses sont indiqués, une maîtrise de cette variabilité est primordiale et nécessite l'optimisation de l'individualisation de dose. Le meilleur moyen d'optimiser la posologie est la réalisation du suivi thérapeutique des concentrations (ou TDM pour «Therapeutic Drug Monitoring») ou, éventuellement, par une exploration génétique afin d'adapter la dose chez chaque patient.

En pratique, le TDM est difficilement réalisable pour ces médicaments en raison d'un certain nombre de contraintes. L'obstacle majeur est le schéma d'administration habituel « jour 1=jour 21» empêchant ainsi l'adaptation de doses du cycle même. De plus, en général, le paramètre PK corrélé avec la pharmacodynamique est l'exposition au médicament représentée par la surface sous la courbe des concentrations (ou AUC pour « Area Under the Curve »), et pour déterminer ce paramètre, plusieurs prélèvements sanguins doivent être effectués. Cependant, dans les protocoles de haute dose, le schéma de traitement consiste souvent en 3-5 jours d'administration par cycle (pour limiter la toxicité qui peut dépendre de la concentration maximale). La dose des dernières perfusions peut donc être adaptée selon le TDM réalisé après la première administration. En outre, depuis un certain temps, le nombre de prélèvements sanguins nécessaires pour déterminer l'AUC peut être réduit grâce à la modélisation pharmacocinétique de population (PK-pop) et l'estimation bayésienne, ce qui facilite la mise en place du TDM pour ces protocoles.

Le protocole TICE est l'un des protocoles d'intensification thérapeutique associant 2 cycles de paclitaxel (T pour taxol) et ifosfamide (I) à 3 cycles de haute dose de carboplatine (C) et

d'étoposide (E) pour la prise en charge des patients atteints de tumeur germinale réfractaire ou en rechute. L'essai clinique de phase II que nous avons réalisé consistait en une adaptation de posologie du carboplatine de ce protocole basée sur le TDM de ses concentrations. La dose a été adaptée au 3^{ème} jour selon la clairance observée au premier jour déterminée par analyse bayésienne de 3 concentrations afin d'atteindre l'AUC cible totale sur 3 jours de 24 mg.min/mL.

Ces travaux de thèse débutent par une revue bibliographique présentant tout d'abord le rationnel de l'individualisation de dose des médicaments cytotoxiques et les différents moyens de l'optimiser. Nous exposerons ensuite le principe de la modélisation PK-pop et l'analyse bayésienne pour la détermination des paramètres PK individuels à partir d'un nombre réduit de prélèvements sanguins (prélèvement épars). Enfin, nous présenterons les propriétés pharmaco-thérapeutiques des deux médicaments utilisés à haute dose dans le protocole TICE : le carboplatine et l'étoposide.

Les travaux personnels de cette thèse seront ensuite présentés selon trois parties distinctes :

- La première portera sur les résultats des analyses pharmacocinétiques concernant le carboplatine dont l'objectif est d'évaluer la faisabilité et la performance du TDM dans la maîtrise de l'exposition au carboplatine. De façon complémentaire, l'optimisation de la mise en pratique du TDM et les différents aspects d'individualisation de dose du carboplatine par rapport au TDM seront également évalués.
- La deuxième partie consiste en l'étude de l'implication éventuelle des facteurs génétiques dans la toxicité auditive qui est la toxicité dose-limitante du carboplatine haute dose.
- Enfin, dans la troisième partie seront présentés les résultats des analyses pharmacocinétiques et pharmacogénétiques de l'étoposide dont l'objectif est d'évaluer si une adaptation de dose par le TDM ou par le génotype des patients pourrait se justifier pour ce médicament dans ce protocole.

Ces travaux de thèse permettront d'améliorer la prise en charge des patients traités par ce protocole à haute dose de carboplatine et étoposide et, au-delà de cette indication thérapeutique, notre connaissance de ces deux médicaments cytotoxiques importants.

Revue bibliographique

I. INDIVIDUALISATION DE DOSES DES MEDICAMENTS CYTOTOXIQUES

I.A. Rationnel

Les cytotoxiques sont des médicaments anticancéreux qui agissent directement ou indirectement sur l'ADN des cellules entraînant ainsi l'apoptose chez les cellules en prolifération rapide dont les cellules tumorales. Par conséquent, ils sont extrêmement toxiques, peu spécifiques et provoquent souvent des toxicités à des doses généralement nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique. Il s'agit donc de médicaments à marge thérapeutique très étroite et souvent caractérisés par une forte variabilité interindividuelle pharmacocinétique (variation d'un facteur de 2 à 10 de l'exposition chez les patients recevant des doses standards¹⁻³). Pour certains d'entre eux, des relations entre la pharmacocinétique et la réponse clinique ont été décrites. Mais, c'est surtout la relation PK/toxicité qui a été démontrée dans plusieurs études. Elle concerne principalement la toxicité hématologique (e.g. corrélation entre la concentration plasmatique et la neutropénie)⁴⁻⁷. Ces caractéristiques expliquent pourquoi une même dose peut entraîner une toxicité très importante chez certains patients et l'absence d'effet anti-tumoral chez d'autres. L'individualisation de dose permettrait donc de réduire l'échec du traitement par sous-exposition ou la toxicité excessive par surexposition à ces médicaments. Habituellement, la dose des cytotoxiques est calculée en fonction de la surface corporelle (BSA pour « body surface area ») bien que l'utilisation de cette approche soit un sujet de controverse. Cependant, il existe d'autres stratégies qui permettent d'optimiser l'individualisation de doses de ces médicaments : la méthode *a priori* basée sur les caractéristiques des patients, la méthode de dose-test et enfin le suivi thérapeutique pharmacologique (TDM).

I.B. Méthode conventionnelle

Pour la plupart des médicaments cytotoxiques, la dose utilisée est celle en mg/m² recommandée pour les essais de phase II. Cette dose recommandée est basée sur les résultats des essais de phase I et cette recommandation se fait sans prendre en compte la pharmacocinétique du médicament. En cas de toxicité, soit la dose est diminuée soit l'administration est retardée mais l'augmentation de dose est rarement réalisée en absence de toxicité. En raison du faible index thérapeutique des cytotoxiques, il est probable que les patients ne présentant aucune toxicité soient sous exposés⁷. La pratique de calcul de dose en fonction de la BSA pour les essais cliniques de phase I repose sur des observations que la dose maximale tolérée de certains cytotoxiques exprimée en mg/m² est comparable entre différentes espèces^{8,9}. Ensuite, cette pratique a été adoptée par convention dans la pratique clinique sans aucune validation.

La normalisation de dose par la BSA a pour objectif d'homogénéiser l'exposition aux médicaments cytotoxiques. En effet, elle est utile pour la transposition des doses entre différentes espèces ou entre enfant et adulte⁷. Cependant, de nombreuses études ont montré que la BSA (dont la formule de calcul la plus couramment utilisée est celle du Dubois et Dubois¹⁰) n'est ni corrélée avec le débit de filtration glomérulaire¹¹ ni associée à la fonction hépatique^{12,13}. De manière attendue, il a été démontré que les paramètres PK (et tout particulièrement la clairance d'élimination) de plusieurs cytotoxiques étaient très peu corrélés avec cette covariable^{12,14-18}. De plus, il a été démontré que chez les patients obèses (>80 kg), la formule de Dubois et Dubois peut sous-estimer la BSA jusqu'à 20%¹⁹.

Puisque l'apport de la BSA dans la maîtrise de la variabilité interindividuelle de l'exposition aux cytotoxiques est minime, une alternative a été proposée consistant à administrer la même dose (en mg) à tous les patients (ou « fixed dosing » ou encore « the flat dose » en anglais). Cette approche est une pratique courante en dehors de la cancérologie. Elle peut être facilement généralisée et permet de simplifier la préparation de la chimiothérapie. Effectivement, une dose unique peut être préparée bien à l'avance pour les médicaments qui sont suffisamment stable (ce qui est le cas pour la plupart des cytotoxiques) permettant ainsi de faciliter l'automatisation de la préparation, réduire les erreurs, diminuer la durée d'attente des patients et améliorer la capacité de gestion de la pharmacie hospitalière²⁰. Un certain

nombre d'études ont été menées pour évaluer la non-infériorité de cette approche par rapport à la méthode de calcul de dose basée sur la BSA, mais les résultats sont contradictoires²¹⁻²⁴. Une autre alternative récemment suggérée est la méthode dite « dose banding » qui consiste à prédéfinir quelques intervalles de BSA et à administrer la même dose aux patients appartenant au même intervalle. Introduite par Plumridge et al.²⁵, cette approche permettrait de combiner les avantages de la méthode « flat dose » et du calcul de dose basé sur la BSA. Une étude rétrospective réalisée par Chatelut et al.²⁴ a montré que, pour cinq des six médicaments évalués, il n'y avait pas de différence significative de la variabilité interindividuelle des AUCs entre la méthode « dose banding » et le calcul de dose en fonction de la BSA.

I.C. Adaptation *a priori* de dose basée sur les caractéristiques des patients

Cette approche est basée sur la contribution relative des caractéristiques identifiables du patient, du traitement, et de l'état de la maladie qui influencent les concentrations plasmatiques du médicament. La dose peut être donc individualisée pour chaque patient en fonction de ces caractéristiques. Il peut s'agir du calcul de dose nécessaire pour atteindre une exposition (AUC) cible ou une simple adaptation de dose selon l'état de la fonction biologique du patient. Le premier cas s'applique aux médicaments dont la clairance d'élimination (CL) est étroitement liée à la fonction rénale. Dans ce cas-là, une formule basée sur les caractéristiques morphologiques, biologiques et physiologiques pouvant influencer l'état rénal du patient permet de prédire la clairance de chaque patient et ainsi de calculer la dose selon la relation : $Dose = CL \times AUC$. L'exemple le plus connu est le carboplatine. Le second cas consiste souvent en une réduction de la dose chez les patients en insuffisance rénale ou hépatique. Elle est recommandée pour l'étoposide, les taxanes, les anthracyclines, le topotécan, l'oxazaphosphorines, les vinca-alkaloids ou le melphalan^{7,26}. Pour un certain nombre d'autres médicaments, leurs concentrations plasmatiques peuvent être influencées par des variations d'origine génétique de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans leur métabolisme. Cela peut amener à une adaptation de dose selon le génotype des patients (5-fluorouracile, irinotécan, 6-mercaptopurine...) ²⁷⁻³⁰.

I.D. Méthode de dose-test

Cette approche a été quelque fois utilisée pour le méthotrexate. Elle est composée de deux étapes. La première consiste à déterminer les paramètres PK individuels à partir des prélèvements multiples après une injection bolus d'une dose modérée du médicament. La seconde étape consiste à calculer la dose nécessaire pour atteindre une AUC cible en se basant sur les valeurs observées de ces paramètres. Cependant, le principe de cette méthode fait l'objet de discussion car elle ne peut être utilisée que lorsque la cinétique est linéaire (ce qui n'est pas le cas pour le méthotrexate à haute dose) et nécessite des prélèvements supplémentaires chez les patients. De plus, cela impose un délai avant la mise en place du traitement.²⁶

I.E. Suivi thérapeutique pharmacologique (TDM)

Le TDM représente le meilleur moyen d'optimiser l'individualisation de dose. Il peut être défini comme la mesure des concentrations du médicament ou de ses métabolites actifs dans des prélèvements biologiques (souvent le plasma) afin d'individualiser le traitement en adaptant la posologie pour *in fine* améliorer l'efficacité et/ou réduire la toxicité⁶. Cependant, l'adaptation de dose par le TDM n'est pas, jusqu'à présent, une pratique systématique pour les cytotoxiques sauf pour le méthotrexate administré à haute dose (>1 g/m² par perfusion intraveineuse). Plusieurs facteurs sont mis en cause : la difficulté d'établir un intervalle thérapeutique cible, la difficulté analytique et le schéma d'administration particulier des cytotoxiques. Malgré tout, le TDM est envisagé pour de plus en plus de cytotoxiques (5-fluorouracile, busulfan, taxanes, etoposide, mitotane ...).

I.E.1. Contraintes à la réalisation du TDM des cytotoxiques

a). Difficulté d'établir l'intervalle thérapeutique cible

La concentration plasmatique est une mesure indirecte de la quantité de médicament au site d'action qui se trouve, en général, loin de l'espace intravasculaire ; de plus, les tumeurs

solides ont leurs propres vascularisations. Le cancer est un groupe hétérogène de maladies dont chacune présente des caractéristiques intrinsèques pouvant influencer la relation concentration-effet des cytotoxiques. Par conséquent, plusieurs intervalles thérapeutiques cibles devront être établis pour un même cytotoxique selon le type de cancers pour lesquels il est utilisé. En outre, l'hétérogénéité de la vascularisation et des caractéristiques des cellules tumorales entraînent différents degrés de sensibilité et de résistance contribuant donc à la variabilité interindividuelle de réponse. Par ailleurs, les cytotoxiques sont souvent administrés en association avec d'autres molécules anticancéreuses, ce qui rend l'évaluation de la relation concentration-effet encore plus complexe. Enfin, il existe un délai entre la mesure de la concentration et l'évaluation de l'effet pharmacodynamique. Si le taux de guérison est utilisé comme variable de l'efficacité du traitement, un temps de suivi de 5 ans sera nécessaire pour évaluer précisément la réponse. Tous ces facteurs rendent la détermination de l'intervalle thérapeutique difficile et compliquée pour chaque médicament cytotoxique.³⁰⁻³²

b). Difficulté analytique

Certains cytotoxiques fréquemment utilisés sont des pro-drogues et nécessitent une activation *in vivo* pour être actifs. Les métabolites activés sont souvent instables et pourraient être produits dans l'espace intracellulaire, rendant donc leur dosage difficile. En outre, les autres contraintes sont l'absence d'équipement, de méthode de dosage appropriée et de personnels qualifiés pour effectuer des prélèvements aux horaires programmés et pour mesurer, à temps réel, les niveaux de concentrations des médicaments dans les échantillons biologiques.⁶

c). Schéma d'administration particulier

Pour la plupart des cytotoxiques, l'exposition totale au médicament représentée par l'AUC est mieux corrélée avec l'effet pharmacodynamique qu'une seule concentration. Cependant, ces médicaments sont habituellement administrés par cycles espacés de 21 jours pour permettre la résolution des effets indésirables, tout particulièrement un retour à la normale des taux d'éléments figurés sanguins. Ce schéma d'administration « jour 1 = jour 21 » est une contrainte à la réalisation en routine du TDM car l'AUC d'un patient n'est obtenue qu'après l'administration complète du médicament. Même si la valeur observée de l'AUC est

significativement différente de la valeur cible, aucune modification de dose ne sera possible car le médicament a déjà été administré. L'adaptation de dose ne peut être considérée que pour le cycle suivant en se basant sur le résultat pharmacocinétique obtenu. En pratique, la dose est généralement diminuée en cas d'observation de toxicités importantes pendant la période inter-cycle. La réalisation du TDM devrait permettre une augmentation de doses pour les patients sous-dosés, mais cela n'est pas pratiqué en routine.⁵

I.E.2. Stratégie de prélèvements limités pour l'estimation de l'AUC

Lorsqu'il s'agit de l'AUC cible (et non pas des concentrations seuils) qui doit être atteinte lors du TDM, il faut connaître l'AUC observée chez le patient pour pouvoir adapter la dose. Dans le cas d'une perfusion longue continue d'un médicament à courte demi-vie (e.g., 5-fluorouracile ou 5-FU), l'AUC peut être facilement déterminée à partir d'une seule concentration à l'état d'équilibre (C_{SS}). En revanche, dans le cas d'une perfusion intraveineuse courte, un nombre important de prélèvements sanguins seront nécessaires, ce qui constitue une contrainte financière pour l'établissement de santé et un inconvénient aussi bien pour les patients que pour le corps médical. Les stratégies de prélèvements limités ont donc été développées pour permettre l'estimation de l'AUC et d'autres paramètres PK à partir de quelques prélèvements sanguins chez chaque patient. Parmi les différentes approches utilisées, on peut citer la régression linéaire multiple et, plus récemment, la modélisation PK-pop couplée à l'estimation bayésienne.

a). Régression linéaire multiple

Cette méthode consiste à établir une équation de régression linéaire entre l'AUC et un petit nombre de concentrations plasmatiques (généralement 2 ou 3) correspondantes aux prélèvements sanguins effectués aux temps spécifiés :

$$AUC = A_0 + A_1.C_1 + A_2.C_2 + A_3.C_3 + \dots$$

Où $A_0, A_1, A_2, A_3 \dots$ sont des constantes et $C_1, C_2, C_3 \dots$ sont des valeurs de concentrations obtenues aux temps $t_1, t_2, t_3 \dots$. Certaines formules intègrent, en plus, une fonction de dose :

$$\text{AUC} = A_0 + A_1.C_1 + A_2.C_2 + A_3.C_3 + \dots + f(\text{dose})$$

Où, par exemple, $f(\text{dose}) = \text{constante} \times \text{dose (mg/m}^2\text{)}$. Cependant, la plage de doses dans laquelle la formule a été validée est en générale étroite (e.g., $\pm 25\%$).

La régression linéaire multiple n'est pas basée sur un modèle PK, et l'équation ne résulte que de la simple corrélation (et corrélation croisée) entre des temps de prélèvements et l'AUC. Cette méthode a été proposée pour le suivi des AUCs de quelques médicaments et métabolites (étoposide, doxorubicine, carboplatine, cyclophosphamide, topotecan, irrinotécan et métabolites). Malgré sa simplicité, elle est difficilement utilisée en pratique car il faut strictement respecter les temps de prélèvements spécifiés dans l'équation. Et si un prélèvement est manquant, l'équation et les autres mesures de concentration seront inutiles.^{26,33}

b). Pharmacocinétique de population et analyse bayésienne

Le concept de l'estimation bayésienne des paramètres PK a été introduit pour le TDM dans les années 1970s par Sheiner et *al.*³⁴. Elle consiste à déterminer les paramètres PK individuels à partir des informations provenant de chaque individu en termes de leurs données de concentrations et des connaissances préexistantes sur la valeur moyenne du paramètre en question ainsi que sa distribution (exprimée en variance) dans la population étudiée. Les connaissances *a priori* du paramètre peuvent être obtenues par différentes analyses PK-pop dont la plus utilisée actuellement est la modélisation non linéaire à effets mixtes³⁵. En général, quelques concentrations (2 ou 3) sont nécessaires pour prédire les valeurs individuelles des paramètres PK par cette approche avec un faible biais et une bonne précision. En outre, elle permet également une flexibilité par rapport au temps de prélèvements (à condition que les horaires réels soient renseignés).

II. PRINCIPE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION ET ANALYSE BAYESIENNE

II.A. Approches en deux étapes

Comme leur nom l'indique, ces approches pharmacocinétiques s'effectuent en deux étapes dont la première consiste à estimer séparément les paramètres PK de chaque sujet et, la seconde, à calculer les paramètres de population (i.e., la moyenne, la variance et covariance des paramètres). La plus connue est l'approche "standard en deux étapes" (ou STS pour « Standard Two-Stage »), largement utilisée pour les études de bioéquivalence. Dans cette approche, l'estimation des paramètres individuels de la première étape est effectuée, le plus souvent, par l'approche modèle indépendante basée sur la méthode dite des trapèzes. Elle nécessite donc un nombre important de prélèvements sanguins (habituellement ≥ 6 prélèvements par sujet). De plus, elle a tendance à surestimer la dispersion des paramètres PK en raison de l'impossibilité de prendre en compte l'erreur d'estimation des paramètres individuels et la variabilité résiduelle. Une autre approche dite "itérative en deux étapes" (ou ITS pour « Iterative Two-Stage ») repose sur la modélisation qui tient compte des paramètres de population préalablement estimés (e.g., par l'approche STS) pour estimer les paramètres individuels de la première étape. Ensuite, de nouveaux paramètres de population sont obtenus à partir de ces paramètres individuels et servent à ré-estimer de nouveaux paramètres individuels. Ce processus se répète jusqu'à ce que la différence entre la valeur des nouveaux paramètres de population et celle des paramètres de population initiaux soit nulle. Théoriquement, cette approche ne nécessite pas de données riches, mais un profil PK complet est souvent préféré.

II.B. Modélisation non linéaire à effets mixtes

La pharmacocinétique de population à proprement dite a été introduite par Sheiner et *al.*³⁵ en 1972 et est de plus en plus utilisée actuellement. Contrairement aux deux approches précédentes, les paramètres PK moyens dans une population ainsi que la variabilité intra- et interindividuelle sont estimés en analysant simultanément les données de tous les patients. Une autre particularité est qu'elle permet les analyses à partir d'un nombre limité de données

par individu (prélèvement épars ou « sparse sampling » en anglais ; 3-4 prélèvements par exemple). Il faut néanmoins que l'ensemble des prélèvements décrivent l'intégralité du profil des concentrations au cours du temps et il n'est donc pas nécessaire que tous les individus aient des prélèvements aux mêmes moments. Ce nombre limité de prélèvements permet également d'obtenir des données PK chez des populations de patients qui sont difficiles à étudier pour des raisons éthiques telles que les nouveau-nés et les patients gravement malades.

Cette approche est rendue possible grâce à la modélisation dite « non linéaire à effets mixtes » (d'où l'éponyme du logiciel le plus utilisé pour résoudre ce type d'analyse : NONMEM). « Non linéaire » désigne la non linéarité de la relation entre la variable dépendante (i.e., concentration en PK) et les paramètres du modèle. Les « effets mixtes » contiennent à la fois « les effets fixes » désignant tous les paramètres qui ne varient pas au sein de la population et « les effets aléatoires » regroupant tous les paramètres qui varient d'un individu à un autre. Les différents composants du modèle de population sont : le modèle de structure, les modèles statistiques et le modèle de covariables.

II.B.1. Modèle de structure

Le modèle de structure ou modèle PK compartimental décrit la concentration du médicament au cours du temps à l'aide des équations mathématiques. Le principe consiste à représenter le corps humain comme des compartiments interconnectés. Un compartiment est un volume dans lequel toutes les molécules de médicament réagissent de la même manière (i.e., avec la même probabilité d'entrer ou de sortir avec la même vitesse de transfert). Un modèle est alors construit en enchaînant les compartiments les uns aux autres de façon à pouvoir s'adapter aux phénomènes observés. Différents enchaînements sont possibles, mais le plus courant est de type « mamillaire » (Figure 1). Il s'agit d'un compartiment central (CC), qui représente le plasma et les organes richement perfusés comme le foie et les reins, connecté à un ou plusieurs compartiments périphériques (CP_1, CP_2, \dots), qui sont souvent les organes profonds. Chaque compartiment est décrit par une équation différentielle associant les entrées et les sorties.

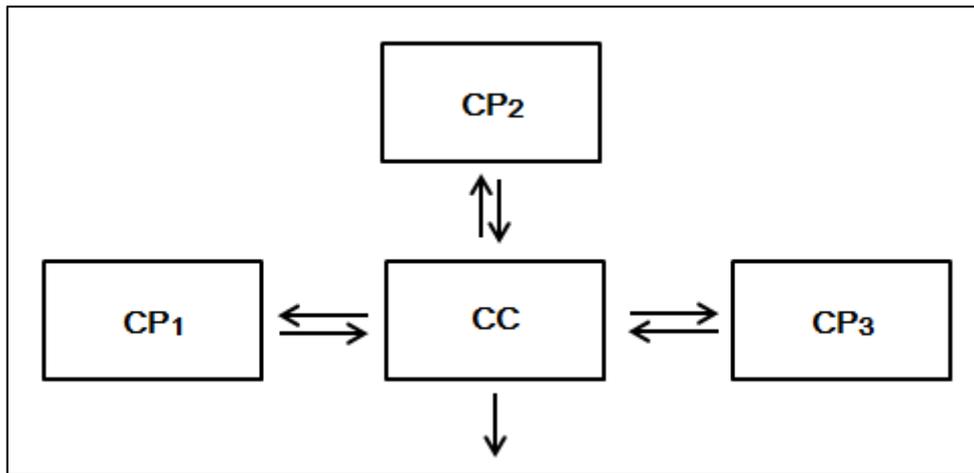


Figure 1. Exemple de modèle mamillaire.

CC : Compartiment central ; CP : Compartiment périphérique.

En pharmacocinétique, les systèmes sont le plus souvent linéaires, c'est-à-dire que les vitesses d'entrée ou de sortie d'un compartiment sont proportionnelles à la quantité de médicament dans ce compartiment (cinétique d'ordre 1) :

$$V(t) = dA(t)/dt = K \cdot A(t)$$

Où : $V(t)$ est la vitesse de transfert ; K une constante ; $A(t)$ la quantité de médicament dans le compartiment à l'instant « t ».

Prenons l'exemple d'un modèle à un compartiment avec administration intraveineuse (Figure 2) :

A $t = 0$, la dose est administrée en totalité dans le compartiment. K_{10} est la constante d'élimination. Ce modèle se décrit selon l'équation différentielle suivante :

$$dA_1/dt = -K_{10} \cdot A_1$$

En appliquant la transformation de Laplace et rapportant la quantité A_1 au volume (V_1), on peut décrire l'évolution de la concentration par l'équation suivante :

$$C(t) = \exp(-K_{10} \cdot t) = \exp[(-CL/V_1) \cdot t] \quad \text{où CL : clairance d'élimination}$$

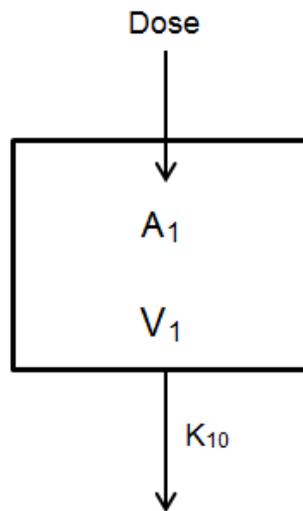


Figure 2. Exemple d'un modèle à un compartiment.

II.B.2. Modèles statistiques

Les modèles statistiques décrivent des effets aléatoires et permettent de quantifier la variabilité. Il y a deux sources importantes de variabilité dans tous les modèles PK-pop : variabilité interindividuelle et variabilité résiduelle (Figure 3). Lorsque le médicament est administré sur deux ou plusieurs occasions (jours, cycles) à chaque sujet, une variabilité inter-occasion (qui s'agit d'une variabilité intra-individuelle) peut aussi être estimée.

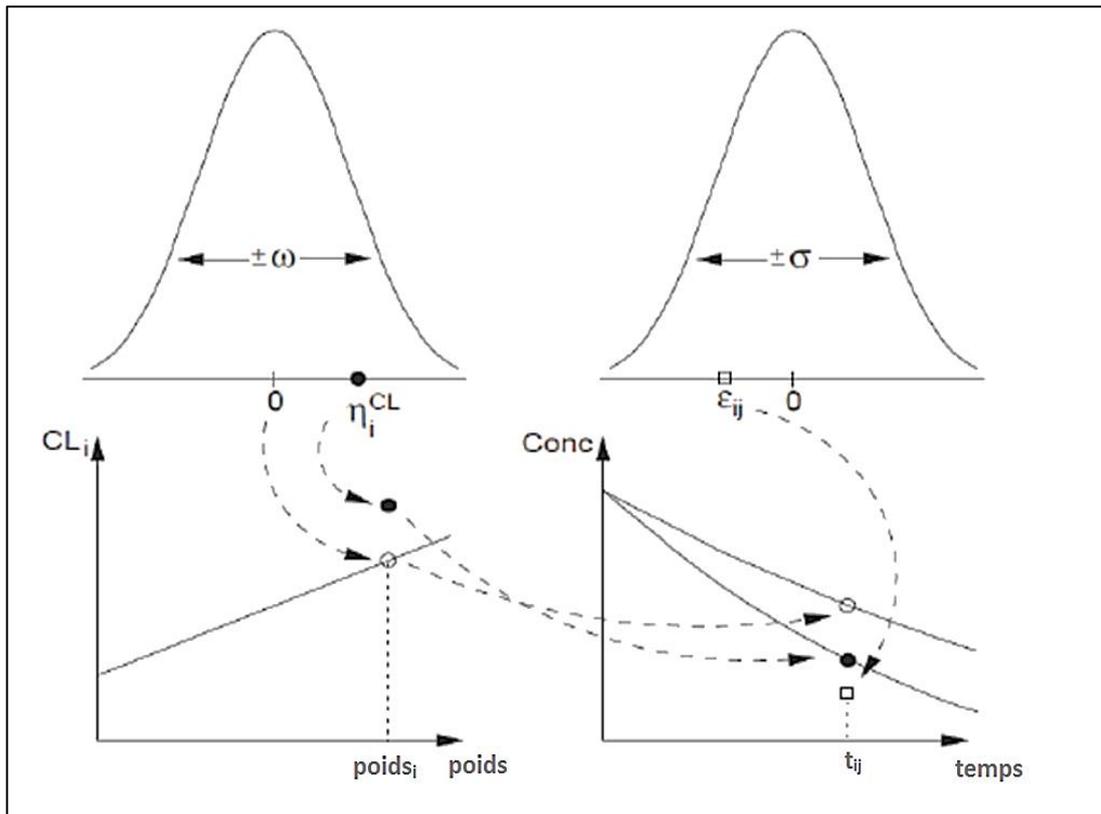


Figure 3. Schéma représentant la variabilité interindividuelle (à gauche) et résiduelle (à droite) du modèle non linéaire à effets mixtes. Pour un individu de poids_i, sa clairance individuelle (•) diffère de la clairance typique (○) par un écart η_i . A partir de ces valeurs de paramètres, le modèle prédit les concentrations aux temps « t_{ij} » pour cet individu et pour l'individu typique de poids_i. Ses concentrations observées (□) au cours du temps s'écartent de celles prédites par le modèle par un écart ε_{ij} .³⁶

a). Variabilité interindividuelle

Pour passer à la modélisation de population, une hypothèse doit être faite, celle que chaque paramètre PK est une variable aléatoire dont les valeurs individuelles diffèrent de la valeur de population par un écart « η » (ETA ; Figure 3) :

$$P_i = P_{pop} + \eta_i$$

« P » représente les paramètres PK qui peuvent être la clairance (CL), volume de distribution (V), « P_i » est la valeur du paramètre pour le $i^{\text{ème}}$ sujet. Dans NONMEM, « P pop » est représenté par « θ » (THETA) et est appelé valeur typique (« typical value » ou TV) du

paramètre. La distribution de η_i suit une loi Normale de moyenne nulle et de variance ω^2 qui représente la variabilité interindividuelle. La variance et covariance des différents paramètres est collectivement représentée dans la matrice Ω (OMEGA).

Dans la littérature, la variabilité interindividuelle des paramètres PK est modélisée en présumant une distribution log-normale en raison de distribution souvent dissymétrique à droite de ces paramètres et pour obtenir des valeurs positives³⁷. L'équation précédente devient :

$$P_i = \theta \cdot \exp(\eta_i) \quad \text{ou} \quad \ln(P_i) = \ln \theta + \eta_i$$

Dans ce cas-là, la variance de η_i est la variance du paramètre PK dans l'échelle logarithmique. L'équation suivante permet de convertir la variance en coefficient de variation (CV) à l'échelle originale du paramètre PK³⁷ :

$$CV (\%) = \sqrt{\exp(\omega^2) - 1} \cdot 100 \%$$

Pour de faibles valeurs de ω^2 , l'expression « $\exp(\omega^2) - 1$ » peut être rapprochée à ω^2 et le coefficient de variation devient : $CV (\%) = \sqrt{\omega^2} \cdot 100\% = \omega \cdot 100\%$ ³⁷

b). Variabilité résiduelle

Cette variabilité correspond à l'écart entre les concentrations observées (C_{obs}) et celles prédites à partir des paramètres PK individuels de chaque patient (\hat{C}) (Figure 3). Ces écarts sont représentés par « ε » (EPSILONE) et suivent une distribution Normale de moyenne nulle et de variance σ^2 [désignée Σ (SIGMA) dans NONMEM]. L'origine de ces écarts est variée. Ils peuvent être dus aux erreurs sur les temps de prélèvement sanguin, aux erreurs de dosages ou à une inadéquation du choix du modèle de structure. La modélisation de la variabilité résiduelle dépend souvent du type de données à évaluer. Plusieurs modèles sont possibles :

- Modèle additif ($C_{\text{obs}} = \hat{C} + \varepsilon$) : ce modèle est approprié quand la variance de l'erreur des données est constante (homoscédasticité) (Figure 4).

- Modèle proportionnel ($C_{obs} = (\varepsilon+1) \times \hat{C}$) : ce modèle peut être considéré quand la variance de l'erreur n'est pas constante (hétéroscédasticité) mais le coefficient de variation l'est (Figure 4).
- Modèle mixte : c'est la combinaison des deux modèles précédents.

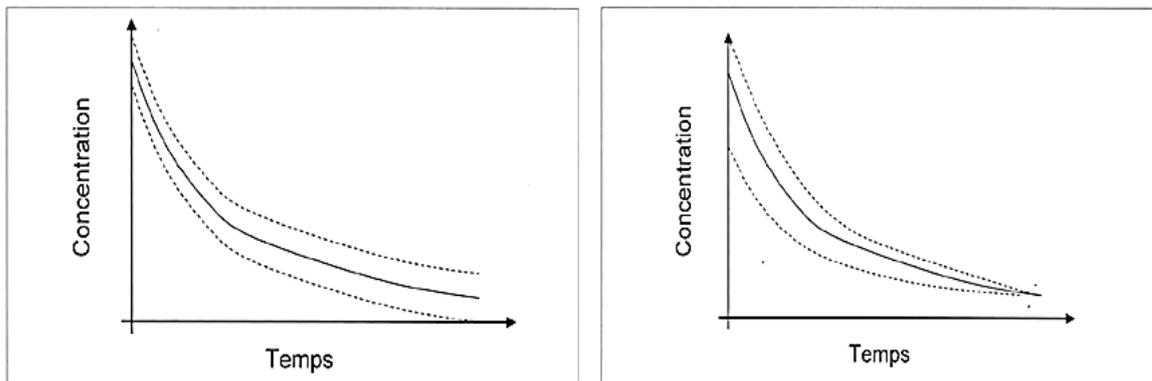


Figure 4. Graphique représentant des données avec une variance constante (à gauche) ou un coefficient de variation constant (à droite).

Parfois, quand les données proviennent de deux ou plusieurs études, la variabilité résiduelle peut être différente entre les études en raison, par exemple, de l'utilisation de différentes méthodes analytiques. Cette variabilité peut être prise en compte en incluant un indicateur ou une variable dans le modèle :

$$C_{obs} = \hat{C} + (1-ETU) \cdot \varepsilon_1 + ETU \cdot \varepsilon_2$$

Où ε_1 , ε_2 correspond à la variabilité résiduelle des études 1 et 2 respectivement et ETU est une variable qui prend une valeur « 0 » s'il s'agit des données de l'étude 1 ou « 1 » si celles de l'étude 2.

c). *Variabilité inter-occasion (IOV)*

Un paramètre PK individuel peut changer d'une occasion à une autre. La source de cette variabilité peut parfois être identifiée (e.g., changement de l'état du patient, observance ou dégradation de la fonction rénale pour un médicament essentiellement éliminé par voie urinaire...). Cette variabilité sur la clairance peut, par exemple, être modélisée de la façon suivante³⁷ :

η_1 : variabilité interindividuelle

Si (Occasion = 1) IOV = η_2

Si (Occasion = 2) IOV = η_3

$$CL = \theta_1 \cdot \exp(\eta_1 + IOV)$$

II.B.3. Modèle de covariables

Les covariables sont des caractéristiques (morphologiques, biologiques, génétiques, ...) qui peuvent influencer un ou plusieurs paramètres PK (Figure 5). L'identification des covariables qui sont prédictives de la variabilité PK est l'objectif de nombreuses études basées sur l'analyse de population.

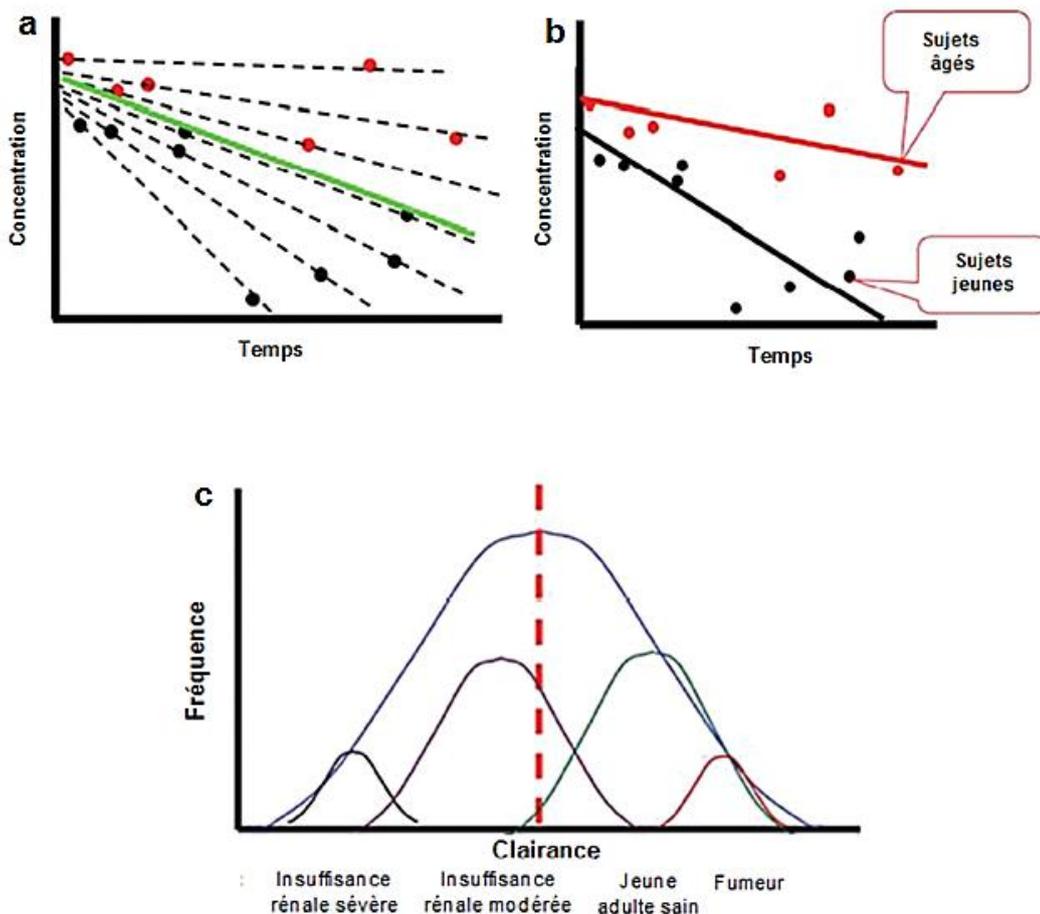


Figure 5. Effet des covariables sur la variabilité pharmacocinétique. (a) Graphique des concentrations en fonction du temps. La droite verte représente la moyenne de population, les lignes noires pointillées représentent la moyenne individuelle, les points rouges désignent les concentrations observées chez les sujets âgés et les points noirs représentent les concentrations observées chez les sujets jeunes. (b) La droite rouge représente la moyenne de population chez les sujets âgés et la droite noire, la moyenne de population chez les sujets jeunes. (c) La représentation de la distribution des valeurs de clairances en fonction de différents caractéristiques des patients.³⁸

Des caractéristiques potentielles (âge, poids, créatinémie...) sont sélectionnées en se basant sur la connaissance des propriétés du médicament, de la famille du médicament ou de la physiologie. Par exemple, pour les médicaments fortement métabolisés, le poids, les enzymes hépatiques et le génotype sont des covariables pertinentes. Ensuite, une corrélation entre chaque covariable et un paramètre PK peut être préalablement visualisée par moyen graphique (« covariate screening » en anglais) avant de passer à la modélisation. Les covariables dont une corrélation est visible seront incluses séparément dans le modèle de la

variabilité interindividuelle et testées individuellement. Pour les covariables quantitatives (e.g., poids, âge, créatininémie...), l'équation suivante peut être utilisée :

$$TVCL = \theta_1 + (\text{poids}) \cdot \theta_2$$

$$CL_i = TVCL \cdot \exp(\eta_i)$$

Le terme « $\theta_1 + (\text{poids}) \cdot \theta_2$ » représente la valeur typique de la clairance (TVCL) pour un poids donné et η_i désigne l'écart de la clairance de chaque sujet ayant le même poids par rapport à la clairance typique pour ce poids.

Pour une covariable qualitative (le sexe par exemple), l'équation peut être :

$$TVCL = (1 - \text{SEX}) \cdot \theta_1 + (\text{SEX}) \cdot \theta_2 \quad \text{où SEX}=0 \text{ si c'est un homme et } =1 \text{ si une femme.}$$

$$CL_i = TVCL \cdot \exp(\eta_i)$$

Dans la littérature, les covariables quantitatives sont souvent normalisées à la valeur moyenne des données, ou à une valeur de référence (e.g., 70 kg pour le poids).

$$TVCL = \theta_1 \cdot \left(\frac{\text{Poids}}{70}\right)^{\theta_2}$$

$$CL_i = TVCL \cdot \exp(\eta_i)$$

Dans une telle équation (appelée fonction allométrique), θ_1 est la valeur typique pour le sujet de référence (ou ayant la clairance moyenne) et θ_2 représente le facteur d'influence de la covariable « poids » sur la clairance.

S'il s'agit d'une covariable qualitative, elle sera codée en puissance et prendra la valeur de 0 ou 1 pour une variable binaire :

$$TVCL = \theta_1 \times (\theta_2)^{\text{SEX}}$$

Dans ce cas, θ_2 représentera le coefficient par lequel la CL est modifiée chez les individus de SEX=1.

II.B.4. Expression générale du modèle

Soit une population de N individus « i », avec pour chacun « j » concentrations. Ainsi C_{ij} est la $j^{\text{ème}}$ concentration de l' $i^{\text{ème}}$ individu et est la variable dépendante du modèle. L'expression générale du modèle s'écrit de la façon suivante :

$$C_{ij} = f(\theta, x_{ij}, z_i, \eta_i, \varepsilon_{ij})$$

Où

θ : le vecteur de p effets fixes du modèle (valeur de population des paramètres PK, facteur d'influence des covariables...) : $\theta = \theta_1, \theta_2, \dots, \theta_p$

x_{ij} : ensemble de variables indépendantes ou explicatives : en pharmacocinétique, il s'agit de la dose administrée (D_i) et le temps correspondant à la $j^{\text{ème}}$ concentration (t_{ij}) ;

z_i : le vecteur des covariables (poids, âge, sexe, créatinine...) pour l'individu « i » ;

η_i : les effets aléatoires interindividuels qui suivent une distribution normale de moyenne nulle et de matrice de variance-covariance Ω constante ;

ε_{ij} : l'erreur résiduelle ou l'effet aléatoire intra-individuel qui affecte la concentration « j » de l'individu « i ». Cet effet aléatoire suit une distribution normale de moyenne nulle et de matrice de variance-covariance Σ constante.

Une fois que le modèle général est défini, l'étape qui suit consiste à estimer les paramètres du modèle (i.e., θ , Ω et Σ). Le principe de l'estimation présente une certaine analogie avec celui de la régression linéaire dans laquelle les paramètres (la pente et l'ordonnée à l'origine) sont estimés à partir des données en se basant sur une méthode à moindres carrés (« least squares » en anglais). La différence entre chaque paire de concentration observée (C_{obs}) et prédite (\hat{C}) donne la résiduelle ($C_{\text{obs}} - \hat{C}$). Les meilleurs paramètres correspondent à ceux qui sont associés à une valeur la plus faible de la somme des carrés des résiduelles dont l'expression peut être considérée comme une « fonction objective » (ou « objective function » en anglais). Chaque paire de paramètres est associée à une valeur de cette fonction objective (OFV) et la plus faible valeur correspond au meilleur ajustement des données (« best of fit »).

Cependant, pour les données PK, c'est la méthode de maximum de vraisemblance (« maximum likelihood estimation » en anglais) qui est utilisée. Dans cette méthode, la fonction objective à minimiser est égale à :

$$\text{OFV} = -2 \times \text{Log}(\text{likelihoods of the data})$$

En raison de la complexité des modèles PK, la recherche de la valeur minimale de l'OFV ne peut pas être effectuée par moyen algébrique et l'approximation numérique est plutôt utilisée. Cela consiste à chercher de façon itérative les valeurs des paramètres minimisant cette fonction. Pourtant, la valeur absolue de la fonction objective n'est pas utile. C'est sa valeur relative entre 2 ou plusieurs modèles qui permettent de les classer en termes de meilleur ajustement des données. En outre, l'OFV suit une distribution de khi-2 (χ^2) qui permet le recours à ce test statistique pour faire une comparaison entre différents modèles.

II.C. Estimation bayésienne des paramètres individuels

Les analyses de PK-pop permettent d'obtenir les paramètres de population. Un estimateur bayésien utilise ensuite ces valeurs de population des paramètres (ainsi que leurs variances) et les données individuelles (i.e., les concentrations observées) pour générer des valeurs individuelles des paramètres en minimisant une fonction objective spécifique. Dans NONMEM, cette étape d'estimation est appelée l'étape de *post hoc*, d'« empirical Bayes » ou « conditional estimation ». Pour un sujet donné, la fonction objective à minimiser peut être, de manière simplifiée, illustrée de façon suivante :

$$\sum_{j=1}^n \frac{\left(C_{\text{obs}j} - \hat{C}_j \right)^2}{\sigma^2} + \sum_{k=1}^m \frac{\left(\theta_k - \theta_{k,\text{pop}} \right)^2}{\omega_{k,\text{pop}}^2}$$

où n est le nombre de concentrations observées ; m est le nombre de paramètres PK ; σ est l'écart-type des concentrations observées et $\omega_{k,\text{pop}}$, l'écart-type du $K^{\text{ème}}$ paramètre PK.

Les paramètres PK individuels (θ_k) sont estimés en minimisant cette fonction à l'aide d'un algorithme mathématique. Autrement dit, on cherche à obtenir l'équilibre entre la déviation des concentrations prédites individuelles (\hat{C}) par rapport aux concentrations observées (C_{obs}) et la déviation de la valeur individuelle des paramètres à estimer (θ_k) par rapport à sa valeur de population ($\theta_{k, pop}$).^{33,34}

Pour les individus ayant des données trop éparpillées ou peu informatives pour le paramètre en question (e.g., les prélèvements sanguins après la phase d'absorption ne renseignent pas sur les paramètres de l'absorption), le second terme l'emporte sur le premier et doit être minimisé. Par conséquent, les valeurs individuelles des paramètres se rapprochent de la valeur de population. On parle donc de l'« η -shrinkage » (un terme anglais pour rétrécissement de l' η). L'étendue du « shrinkage » a des conséquences sur la fiabilité des valeurs individuelles des paramètres. Quand le shrinkage est important (e.g, supérieur à 20-30%), la représentation graphique des paramètres individuels ou « η » *versus* une covariable peut masquer une vraie corrélation, montrer une allure déformée ou indiquer une relation qui n'existe pas. Également, l'exposition (AUC) calculée à partir de la formule « Dose/CL » devient erronée, ce qui réduit, par exemple, le pouvoir de détecter une relation exposition-réponse. L' η -shrinkage peut être déterminé par l'équation suivante :

$$\eta\text{-Shrinkage (\%)} = \left[1 - \frac{SD(EBE\eta)}{\omega} \right] \times 100\%$$

Où ω est la variabilité interindividuelle du paramètre et SD est l'écart-type des valeurs individuelles de η estimées par l'approche bayésienne et appelées « empirical Bayesian estimates » de l' η (EBE η). Le shrinkage de 0% correspond à la situation où le modèle est correctement choisi, les données individuelles sont suffisamment abondantes et les valeurs estimées des paramètres se confondent avec les valeurs réelles. Le shrinkage de 100% est observé quand les données ne contiennent pas d'informations en rapport avec les paramètres en question et les paramètres individuels prennent la valeur typique de population.

L' η -Shrinkage est souvent corrélé avec un autre type de shrinkage qui est l' ε -Shrinkage. Il correspond à la situation où les IPRED se rétrécissent vers les concentrations observées ou IWRES (les résiduelles individuelles pondérées ou « Individual Weighted Residuals » en

anglais) tendent vers 0 entraînant un sur-ajustement des données (« over-fitting »). Ce type de shrinkage se calcule de manière suivante :

$$\varepsilon\text{-Shrinkage (\%)} = 1 - \text{SD}(\text{IWRES}) \quad \text{où } \text{IWRES} = \frac{(C_{\text{obs}} - \hat{C})}{\sigma}$$

Quand l' ε -Shrinkage dépasse 20-30%, le pouvoir de détecter l'inadéquation du choix du modèle (« model misspecification » en anglais) basé sur les IWRES est diminué. L' ε -Shrinkage devient important quand le nombre d'observations (ou données de concentrations) est égal ou inférieur au nombre d'effets aléatoires.

En règle générale, plus la variabilité résiduelle est faible, plus les données sont informatives et moins l' η -Shrinkage sera élevé. Un nombre élevé d'effets aléatoires interindividuels et une forte variabilité de ceux-ci correspondent à un ε -Shrinkage élevé.^{37,39}

II.D. Evaluation d'un modèle

Plusieurs approches sont utilisées pour évaluer un modèle PK de population. L'OFV est généralement utilisée pour sélectionner ou éliminer des modèles pendant la phase précoce du développement du modèle. Différentes représentations graphiques peuvent également permettre de visualiser l'adéquation du modèle. Par ailleurs, la précision des paramètres peut aussi être un indicateur d'un modèle approprié. Ensuite, pour discriminer entre différents modèles « candidats » pour un modèle final, des méthodes basées sur la simulation telle que le « Visual Predictive Check » ou VPC peuvent être utiles. En outre, pour des modèles complexes, le « bootstrap » peut être considéré.

II.D.1. Evaluation graphique

Différents graphiques sont utilisés⁴⁰ :

- concentrations observées *versus* concentrations prédites individuelles (IPRED) ou de population (PRED)

- WRES (résiduelles pondérées ou « Weighted Residuals ») ou IWRES *versus* temps ou PRED
- corrélation entre « Empirical Bayesian Estimates » (EBEs)
- EBE(s) *versus* covariables
- IPRED et PRED *versus* temps pour chaque individu

II.D.2. Précision des paramètres

NONMEM donne une précision associée à chaque paramètre estimé. Elle peut être exprimée en SE « Standard Error » (l'erreur standard) ou en intervalle de confiance (IC) :

$$\text{IC} = \text{Valeur du paramètre} \pm \text{SE}$$

Un modèle avec une mauvaise précision des paramètres est souvent sur-paramétré (« overparameterized model » en anglais). Le niveau de précision qui est acceptable dépend de la taille des données. Il est souvent de l'ordre de < 30% SE pour les effets fixes et < 50% SE pour les effets aléatoires (SE pour les effets aléatoires sont en général plus grand que celui pour les effets fixes). L'évaluation de la précision est importante pour les paramètres décrivant l'effet des covariables. L'IC pour le facteur d'influence d'une covariable contenant la valeur 0 pourrait indiquer que l'estimation de l'effet de la covariable n'est pas fiable.³⁷

II.D.3. « Bootstrap »

Le bootstrap est une méthode alternative à l'estimation de la précision des paramètres par une technique de ré-échantillonnage (« resampling »). Il consiste à créer « x » bases de données dont chacune contient le même nombre de sujets que la base de données initiale. Les sujets qui composent chaque base de données sont tirés au sort, un par un et avec remise, de la base initiale (i.e., le tirage permet de retrouver plusieurs fois le même sujet dans la base de données). Ensuite, chaque base de données est analysée avec le modèle final et les « x » valeurs de chaque paramètre sont récupérées. Si les paramètres sont prédits avec une bonne précision, leur valeur est contenue dans l'intervalle choisi (souvent entre le 2,5^{ème} et le 97,5^{ème} centiles) et ne comprend pas la valeur 0.

II.D.4. « Visual Predictive check »

Le modèle final est utilisé pour simuler de nouveaux datasets avec le même schéma de posologie. Ensuite, les concentrations observées, les centiles (e.g. 5%, 50% et 95%) des concentrations observées, les mêmes centiles des concentrations simulées ainsi que leur intervalle de confiance (90%) sont représentés dans un graphique (Figure 6). Si le modèle est correct, les centiles des concentrations observées doivent se trouver à l'intérieur des intervalles de confiance correspondants.⁴⁰

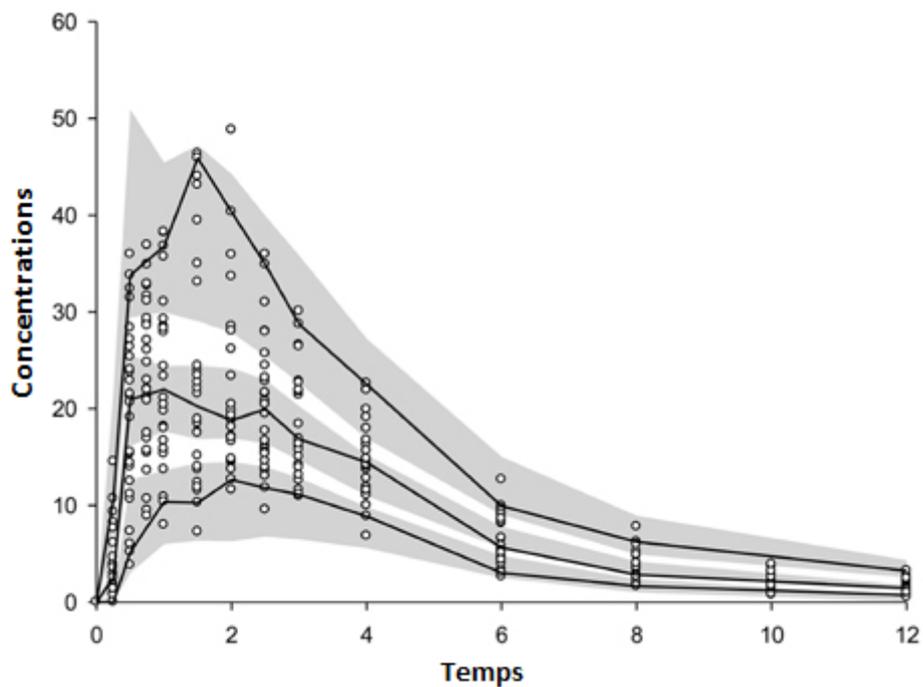


Figure 6. "Visual Predictive Check ou VPC". Les petits cercles représentent les concentrations observées ; les lignes solides représentent le 5^{ème} centile, la médiane et le 95^{ème} centile des concentrations observées et les zones grises sont les intervalles de confiance à 90% des mêmes centiles des concentrations simulées.⁴¹

III. GENERALITES SUR LE CARBOPLATINE

III.A. Présentation

Le carboplatine est un médicament cytotoxique du groupe des alkylants appartenant structurellement à la famille des dérivés de platine dont le chef de file est le cisplatine. Depuis son introduction en clinique en 1981, plusieurs études ont permis de confirmer son utilisation comme une alternative au cisplatine dans le traitement de plusieurs tumeurs solides. En effet, en tant qu'analogue de deuxième génération du cisplatine, le carboplatine partage plusieurs propriétés structurales et pharmacologiques avec celui-ci. Pourtant, il est dépourvu de la neurotoxicité et néphrotoxicité dose-limitante que possède son précurseur. Ses caractéristiques lui permettent d'être un candidat idéal pour la chimiothérapie d'intensification de dose.

III.B. Structure chimique et activité pharmacologique

Les dérivés du platine sont des complexes de coordination du platine tétravalent (platine II). En règle générale, ils contiennent tous, en configuration « cis », deux groupements amines et deux ligands anioniques appelés « groupement partant ». Cependant, les deux amines et les deux ligands anioniques peuvent être également remplacés respectivement par une diamine chélatante ou dicarboxylate chélatant.

La structure la plus simple parmi tous les dérivés est celle du cisplatine comportant deux groupements amines et deux atomes de chlore (Figure 7). Le carboplatine a une structure plus complexe constituée de deux groupements amines et d'un groupement cyclobutane dicarboxylé.

Après l'administration, les dérivés du platine subissent une hydrolyse spontanée (non enzymatique) qui va se dérouler successivement sur les deux ligands anioniques. Cette réaction aboutit à la formation d'un composé parfaitement identique pour tous les dérivés, le « diaquaplatine » qui constitue le métabolite actif. Il possède une activité cytotoxique et est responsable à la fois de l'activité anti-tumorale et des effets indésirables. C'est la stabilité du

carboplatine vis-à-vis de cette hydrolyse qui détermine les différences en termes de propriétés pharmacocinétiques et de profil de toxicité entre celui-ci et le cisplatine.⁴²

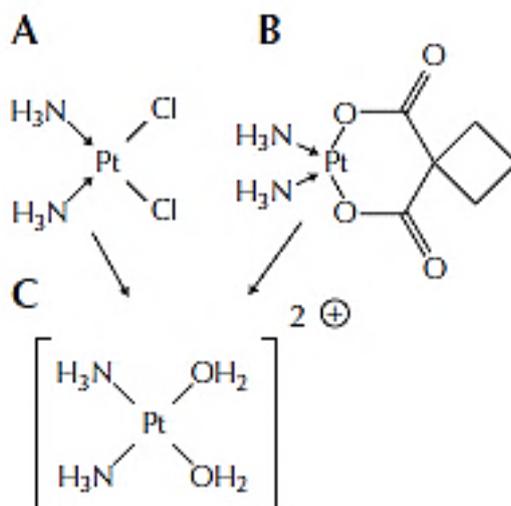


Figure 7. Structure chimique du cisplatine (A), carboplatine (B) et leur métabolite actif « diaqua-platine » (C).⁴³

III.C. Mécanisme d'action cytotoxique

Les dérivés diaqua-platines sont des éléments extrêmement électrophiles qui, à proximité de l'ADN, vont former des liaisons covalentes avec différentes bases, tout particulièrement avec l'azote 7 de la guanine (Figure 8). Cette réaction est responsable de la formation de ponts intra- et inter-brins, ce qui va entraîner une distorsion de la double hélice d'ADN. Ces adduits vont perturber les phénomènes de la réplication et de la transcription de l'ADN. En plus de son action directe sur l'ADN, l'implication d'autres éléments cellulaires dans la cytotoxicité du carboplatine (et cisplatine) a été aussi décrite : protection des adduits vis-à-vis des phénomènes de réparation par les protéines de la famille *high mobility group* (HMG, en particulier HMGB1) et déclenchement de l'apoptose par le système *mismatch repair* (MMR) suite à la reconnaissance des adduits.

Les dérivés du platine ont une activité cytotoxique cycle-dépendante: ils perturbent les différentes phases constituant le cycle de division cellulaire. L'intensité de l'effet cytotoxique correspond donc au produit concentration x temps ($C \times t$). Cette caractéristique s'oppose à celle des anti-métabolites qui possèdent une activité phase-dépendante et nécessitent une durée d'exposition suffisante pour maximiser la probabilité d'exposer les cellules tumorales en « phases sensibles » aux médicaments. Par conséquent, en termes de relation pharmacocinétique-pharmacodynamie (PK-PD), l'AUC est le paramètre PK le plus pertinent pour le carboplatine. De plus, cela justifie les schémas d'administration (i.e., perfusion intraveineuse (IV) courte) adoptés pour les dérivés de platine.⁴⁴⁻⁴⁶

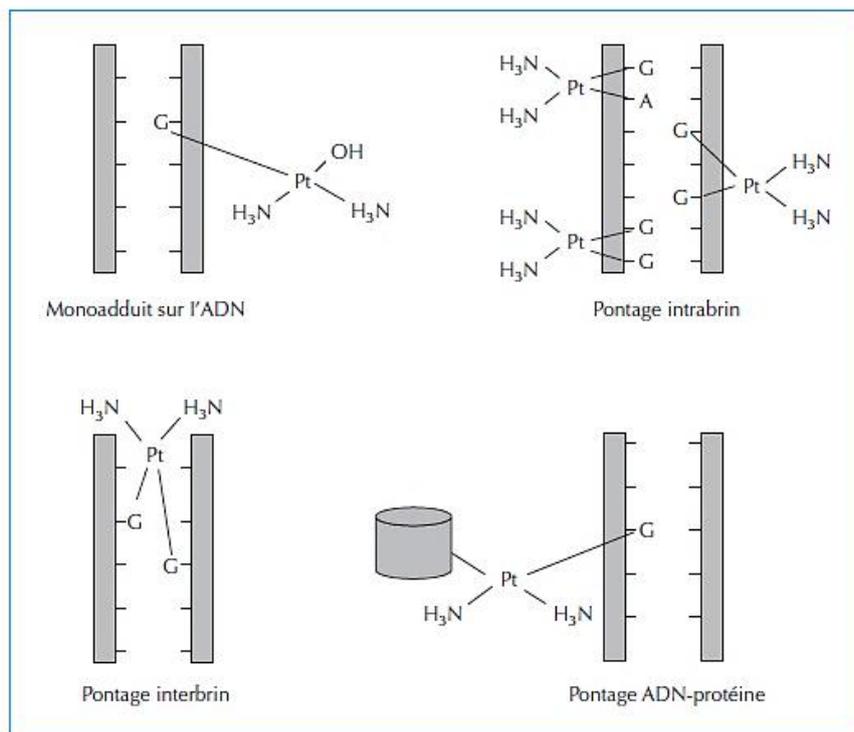


Figure 8. Structure des différents adduits de platine⁴⁵

III.D. Propriétés pharmacocinétiques

Le carboplatine n'est pratiquement pas absorbé par voie orale. En clinique, il est donc administré en perfusion IV ou, dans certains protocoles, intrapéritonéale (IP)^{47,48}. Après l'administration, le platine se trouve dans le plasma sous trois formes: le platine lié (tout particulièrement aux protéines plasmatiques), la molécule du carboplatine libre et les produits de dégradation contenant le platine décarboxylé⁴⁹. Les deux derniers composés constituent « le platine libre ou ultrafiltrable (UF) ».

Le carboplatine se fixe de manière irréversible aux protéines plasmatiques. Par conséquent, la fraction liée [i.e. le rapport (concentration liée aux protéines / la concentration totale)] augmente au cours du temps car la forme liée est éliminée beaucoup plus lentement que la forme libre. Cette fraction liée est d'environ 24% pendant les quatre premières heures après l'administration IV et atteint 87% à 24 heures⁵⁰. Le profil d'élimination du platine plasmatique total (libre + lié) est presque superposable à celui du platine UF pendant les 6 premières heures après l'administration⁵¹.

L'excrétion se fait quasi-exclusivement par les reins. Environ 65%-70% de la dose totale est éliminée sous forme inchangée dans les urines pendant les 12-16 heures suivant l'administration, et les 30%-35% restants, constitués de platine lié aux protéines plasmatiques et ainsi inactif, sont éliminés lentement au cours des 5 jours suivants⁵¹⁻⁵³.

La pharmacocinétique du carboplatine peut être décrite par un modèle bicompartimental dans lequel l'élimination se fait à partir du compartiment central. La clairance est proportionnelle à la filtration glomérulaire et le volume de distribution du compartiment central est corrélé avec le volume du liquide extracellulaire⁴⁹. La clairance du platine ultrafiltrable (CL_{UF}) est en moyenne de 107 mL/min avec une clairance rénale de 81 mL/min et une clairance non-rénale de 26 mL/min⁵⁴.

III.E. Méthodes analytiques appliquées en pharmacocinétique

La concentration du carboplatine peut être déterminée par 3 types de méthodes :

- *La spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA)*^{55,56} qui permet de déterminer les concentrations de platine dans la matrice biologique. Il s'agit d'une méthode antérieurement développée pour le cisplatine, qui peut s'appliquer au carboplatine, afin de déterminer les concentrations UF, plasmatiques, mais également urinaires ou encore tissulaires (après digestion des tissus). Les échantillons en solution sont portés à une température progressivement croissante dans un four en graphite, permettant d'abord l'évaporation de l'eau, puis l'atomisation des impuretés et enfin, à la température optimale de 2400°C, l'atomisation du platine. Une longueur d'onde spécifique au platine est ensuite dirigée vers ces vapeurs atomiques, et la quantité de la radiation absorbée est proportionnelle à la concentration du platine.

- *La spectrophotométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS)*^{57,58} qui, comme la SAA, permet de déterminer les concentrations de platine dans la matrice biologique. Le platine contenu dans les échantillons est d'abord atomisé et ionisé dans une torche à plasma à très haute température (7500-10000°K⁵⁹) et puis, séparé, détecté et dosé par le spectrophotomètre de masse.

- *La chromatographie liquide de haute performance (HPLC)* qui, moins utilisée que les 2 méthodes précédentes, permet de déterminer spécifiquement les concentrations de la molécule de carboplatine. L'HPLC peut être en phase normale ou en phase inverse et il existe différents types de détection : détection UV^{60,61}, dérivatisation post-colonne suivie d'une détection UV^{62,63}, détection par liaison à un groupement phosphorescent⁶⁴, détection électrochimique⁶⁵ ou détection à barrettes de diode⁶⁶. Depuis, la fin des années 1990, des techniques d'HPLC couplées à de la spectrométrie de masse (LC-MS)^{67,68}, couplées à une torche à plasma (LC-ICP-MS)^{69,70}, ou couplées à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS)^{71,72} ont été développées permettant de baisser le seuil de détection.

Dans les études PK, ce sont les paramètres PK de la forme libre ou ultrafiltrable (non lié aux protéines plasmatiques) du carboplatine qui sont étudiés. Pour doser le platine ultrafiltrable, toutes les méthodes analytiques sont précédées d'une phase de prétraitement de l'échantillon permettant d'obtenir l'ultrafiltrat (Figure 9). Cependant, il est possible de doser le carboplatine dans le plasma (carboplatine plasmatique total) ou dans d'autres matrices.

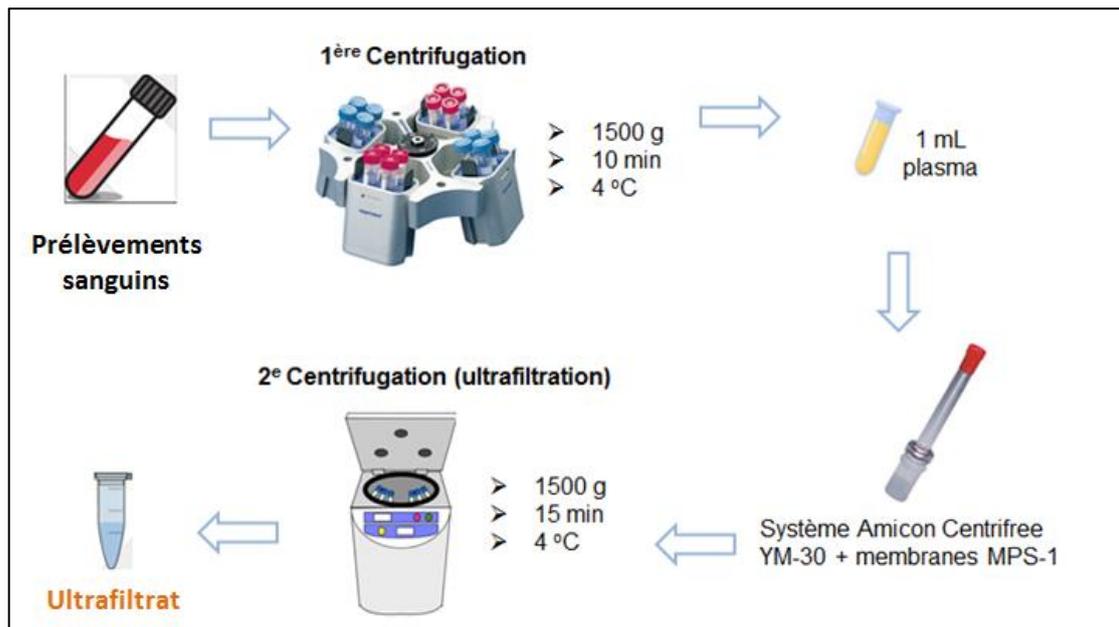


Figure 9. Différentes étapes pour obtenir le platine ultrafiltrable. Les échantillons sanguins sont centrifugés à 1500 g, à +4°C pendant 10 min dans les 20 min suivant le prélèvement, puis 1 mL de plasma obtenu est ultrafiltré au travers d'une membrane de type Centrifree micropartition system (Amicon) à 1500 g, à +4°C pendant 15 min pour obtenir l'ultrafiltrat qui contient du platine ultrafiltrable.

III.F. Individualisation de doses

Le carboplatine est le seul médicament cytotoxique pour lequel le calcul de dose est basé sur une valeur cible de l'AUC des concentrations plasmatiques ultrafiltrables (et non en mg/m²). La dose est déterminée par la relation : $Dose = AUC \text{ cible} \times CL_{UF}$. Cette méthode est adoptée pour le carboplatine en raison à la fois de sa fixation irréversible aux protéines plasmatiques et de son élimination quasi-exclusivement par filtration glomérulaire. De plus, la corrélation entre l'AUC du carboplatine et la pharmacodynamique a été bien documentée⁷³⁻⁷⁵. Pour un protocole de chimiothérapie donné, il est donc nécessaire de définir une AUC cible et de se donner le moyen de prédire la clairance.

En général, une AUC cible est empiriquement choisie en fonction des chimiothérapies concomitantes et de traitements antérieurs^{73,76,77}. Une AUC cible de 7 mg.min/mL est indiquée dans les protocoles de carboplatine en monothérapie chez les patients non prétraités et 6 mg.min/mL en cas de prétraitement. Chez les patients lourdement prétraités ou en cas d'association avec d'autres molécules myélosuppressives (etoposide, cyclophosphamide ou vinorelbine), une AUC cible entre 3-5 mg.min/mL doit être considérée^{52,78,79}. En cas

d'association avec le paclitaxel, l'AUC cible est de 6 mg.min/mL en raison d'une interaction pharmacodynamique entre le paclitaxel et le carboplatine (réduction de l'incidence de thrombopénie induite par le carboplatine)⁸⁰⁻⁸².

En raison de son élimination principalement rénale et de l'hétérogénéité de la fonction rénale, le carboplatine présente une variabilité interindividuelle importante d'ordre pharmacocinétique⁸³. Différentes formules de prédiction de la clairance ont été développées dans l'optique de réduire cette variabilité en tenant compte des caractéristiques pertinentes des patients. Ces formules permettent donc l'individualisation *a priori* de doses du carboplatine.

➤ *Formule de Calvert*⁷⁸

$$\text{Dose de carboplatine (mg)} = \text{AUC}_{\text{cible}} \text{ (mg.min/mL)} \cdot (\text{GFR} + 25)$$

Où GFR (mL/min) : débit de filtration glomérulaire (« Glomerular Filtration Rate » en anglais).

Cette formule est basée sur l'observation d'une forte corrélation entre le GFR et la clairance rénale du carboplatine. Le terme « GFR + 25 » correspond à la clairance du carboplatine qui est proportionnelle au GFR ajoutée de 25 (sa clairance non-rénale). Initialement, le GFR était déterminé par la méthode isotopique qui consistait à injecter par voie intraveineuse l'acide éthylènediaminetétraacétique marqué au chrome 51 (⁵¹Cr-EDTA), une molécule chimiquement stable éliminée uniquement par filtration glomérulaire. Cependant, l'utilisation de cette technique en pratique de routine est limitée par différentes raisons telles que la nécessité de pouvoir disposer d'un centre de médecine nucléaire, le coût de cette technique et la durée d'hospitalisation supplémentaire pour le patient.

Puisque la créatinine, une molécule endogène, est essentiellement éliminée par la filtration glomérulaire, le GFR peut donc être estimé en calculant la clairance de cette molécule, ce qui permet de prédire ensuite la clairance du carboplatine en routine. Il existe de différentes formules de calcul de la clairance de la créatinine (CrCL), mais les plus utilisées sont:

- Cockcroft-Gault⁸⁴ :

$$\text{CrCL (mL/min)} = \frac{(140 - \text{âge}) \cdot \text{poids}}{\text{créatininémie} \cdot 72} \times 0,85 \text{ (si femme)}$$

[âge (années), poids (kg), créatininémie (mg/dL)]

- Jelliffe⁸⁵ :

$$\text{CrCL (mL/min)} = \frac{[98 - 0,8 \times (\text{\AA}ge - 20)] \cdot \text{BSA}}{\text{cr\u00e9atinin\u00e9mie} \cdot 1,73} \times 0,9 \text{ (si femme)}$$

[\u00e2ge (ann\u00e9es), cr\u00e9atinin\u00e9mie (mg/dL)]

- *Formule de Chatelut*⁸⁶

$$\text{CL}_{\text{carbo}} \text{ (mL/min)} = 0,134 \cdot \text{poids} + \frac{218 \cdot \text{poids} \times (1 - 0,00457 \cdot \text{\AA}ge) \cdot (1 - 0,314 \cdot \text{sexe})}{\text{cr\u00e9atinin\u00e9mie}}$$

[\u00e2ge (ann\u00e9es), poids (kg), cr\u00e9atinin\u00e9mie (\u00b5M), sexe =0 si homme et =1 si femme]

Cette formule permet de pr\u00e9dire directement la clairance du carboplatine \u00e0 partir des caract\u00e9ristiques du patient sans avoir recours \u00e0 l'estimation du GFR. Elle a \u00e9t\u00e9 compl\u00e9t\u00e9e pour tenir compte des patients ob\u00e8ses pour lesquels le poids r\u00e9el est remplac\u00e9 par la moyenne arithm\u00e9tique du poids r\u00e9el et du poids id\u00e9al⁸⁷. Une correction li\u00e9e au biais d\u00fa \u00e0 la diff\u00e9rence dans la m\u00e9thode de mesure de la cr\u00e9atinin\u00e9mie a aussi \u00e9t\u00e9 propos\u00e9e⁸⁸.

- *Formule de Thomas*⁸⁹

$$\text{CL}_{\text{carbo}} \text{ (mL/min)} =$$

$$110 \cdot \left(\frac{\text{cr\u00e9atinin\u00e9mie}}{75} \right)^{-0,512} \cdot \left(\frac{\text{poids}}{65} \right)^{+0,474} \cdot \left(\frac{\text{\AA}ge}{56} \right)^{-0,387} \cdot \left(\frac{\text{cystatine C}}{1,0} \right)^{-0,327} \cdot (0,854)^{\text{SEXE}}$$

[\u00e2ge (ann\u00e9es), poids en (kg), cr\u00e9atinin\u00e9mie (\u00b5M), cystatine C (mg/L), sexe = 0 si homme et =1 si femme]

Cette formule contient, en plus des caract\u00e9ristiques pr\u00e9sentes dans les autres formules pr\u00e9c\u00e9dentes, le taux s\u00e9rique de cystatine C, petite prot\u00e9ine \u00e9limin\u00e9e par filtration glom\u00e9rulaire. Elle a \u00e9t\u00e9 consid\u00e9r\u00e9e comme un nouveau marqueur de la filtration glom\u00e9rulaire meilleur que la cr\u00e9atinine^{90,91}. En effet, le taux de la cr\u00e9atinine dans le plasma d\u00e9pend non seulement de la filtration glom\u00e9rulaire mais aussi de la masse musculaire du patient, ce qui r\u00e9sulte en une surestimation de la clairance chez les patients ob\u00e8ses et d\u00e9nutris. De plus, elle est excr\u00e9t\u00e9e

en petite quantité par sécrétion tubulaire qui augmente quand il y a une augmentation de la créatininémie, entraînant ainsi une surestimation du GFR chez les patients présentant une diminution modérée à sévère du GFR (< 50 mL/min)⁹². Contrairement à la créatinine, la cystatine C est éliminée uniquement par filtration glomérulaire, réabsorbée mais totalement catabolisée par les cellules tubulaires proximales⁹³. En outre, elle est produite par l'ensemble des cellules de l'organisme, ce qui avait permis d'espérer d'en faire un marqueur idéal de la fonction rénale⁹³⁻⁹⁵ : son seul taux plasmatique ne nécessitant aucune autre correction telle que poids, âge, Cependant, les travaux dans le domaine de la néphrologie⁹⁶ ont montré qu'il fallait associer à ce taux de cystatine C sérique d'autres covariables (poids, âge, sexe, albuminémie ...). En outre, dans l'étude où la formule a été développée⁸⁹, l'auteur a démontré que la cystatine C seule associée au poids, à l'âge et au sexe n'a pas permis une meilleure prédiction de la clairance du carboplatine que l'association de la créatinine à ces 3 covariables. En revanche, la combinaison des deux marqueurs (cystatine C et créatinine) avec les autres 3 covariables a entraîné une amélioration significative de la prédiction par rapport aux équations basées seulement sur 4 covariables (i.e., poids, sexe, âge associés à la cystatine C ou la créatinine). Cela montre que la cystatine C ne peut pas complètement remplacer la créatinine. Cette étude a été réalisée sur un nombre relativement limité de patients (n=45) et a fait l'objet d'une validation sur une population plus importante⁹⁷.

➤ *Formule de Thomas modifiée*⁹⁷

CL_{carbo} (mL/min) =

$$117,8 \cdot \left(\frac{\text{créatininémie}}{75}\right)^{-0,450} \cdot \left(\frac{\text{poids}}{65}\right)^{+0,504} \cdot \left(\frac{\text{âge}}{56}\right)^{-0,366} \cdot \left(\frac{\text{cystatine C}}{1,0}\right)^{-0,385} \cdot (0,847)^{\text{SEXE}}$$

[âge (années), poids (kg), créatininémie (µM), cystatine C (mg/L), sex =0 si homme et =1 si femme]

Cette formule a été issue de l'évaluation de la formule de Thomas dans une nouvelle population de patients plus importante et provenant de différents centres (n=357), ce qui a abouti à de nouvelles valeurs de coefficients (puissances). Elle permet une meilleure prédiction de la clairance du carboplatine que la formule Calvert-Cockcroft-Gault aussi bien chez des patients de poids normal que chez des patients obèses et dénutris.

III.G. Indications

Le carboplatine est administré pour le traitement de différents cancers, en mono- ou en polychimiothérapie, et souvent en remplacement du cisplatine en raison de son meilleur profil de toxicité. Les indications les plus courantes seront présentées dans cette partie selon le thésaurus Oncomip (version 2009, 2014 et 2016) et le thésaurus des chimiothérapies de l'Institut Claudius-Regaud (Version 2017).

✓ *Gynécologie :*

- ❖ Cancer de l'ovaire de stade avancé :
 - En monothérapie, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=6 mg.mL/min chez les patientes non prétraitées et 5 chez les patientes prétraitées ou âgées.
 - En association avec le docétaxel, perfusion d'une heure tous les 21 jours. AUC=5 mg.min/mL chez les patientes non prétraitées et 4 en cas de prétraitement.
 - En association avec la gemcitabine et le bévacicumab, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=4 mg.min/mL.
 - En association avec la doxorubicine liposomale pégylée, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC= 5 mg.min/mL.

- ❖ Cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope de stades avancés en 1^{ère} ligne :
 - En association avec le paclitaxel et le bevacizumab, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 6 cycles (bévacizumab : 22 cycles). AUC=6 mg.min/mL.

- ❖ Adénocarcinome de l'ovaire :
 - En association avec le paclitaxel, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=6 mg.min/mL chez les patientes non prétraitées et 5 en cas de prétraitement.

✓ *Pneumologie*

- ❖ Cancer bronchique non à petites cellules (tumeur localisée) :
 - En association avec le paclitaxel, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 4 cycles. AUC=6 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 5 en cas de prétraitement.
 - En association avec la vinorelbine et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 4 à 6 cycles. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

- ❖ Cancer bronchique non à petites cellules de stades avancés :
 - En association avec le pemetrexed avec ou sans le bévacicumab et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant une durée variable selon l'efficacité. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.
 - En association avec la vinorelbine et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 4 à 6 cycles. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.
 - En association avec les taxanes (paclitaxel ou docétaxel) avec ou sans le bévacicumab et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 4 à 6 cycles. AUC=6 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 5 en cas de prétraitement.
 - En association avec la gemcitabine avec ou sans le bévacicumab et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

- ❖ Cancer bronchique à petites cellules :
 - En association avec l'étoposide, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 3 à 6 cycles. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

- ❖ Mésothéliome malin en 1^{ère} ligne :
 - En association avec le pemetrexed et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant une durée variable selon l'efficacité. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.
 - En association avec la gemcitabine et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours pendant 4 à 6 cycles. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

- ✓ *Uro-génital*
 - ❖ Cancer urothélial :
 - En association avec la gemcitabine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

 - ❖ Cancer testiculaire :
 - En monothérapie chez des patients de très bon pronostic, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC=7 mg.min/mL.
 - En association avec l'étoposide et en remplacement du cisplatine, perfusion d'une heure tous les 21 jours. AUC=6 mg.min/mL.

 - ❖ Tumeur germinales métastatiques réfractaires ou en rechute :
 - Intensification Motzer (protocole TICE) : en association avec l'étoposide, perfusion IV (d'une heure) 3 jours de suite pendant 3 cycles précédés par 2 cycles de paclitaxel et ifosfamide. AUC=8 mg.min/mL/jour (soit 24 mg.min/mL pour les 3 jours.)

- ✓ *Cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS)*
 - En association avec 5-FU (avec ou sans le cétuximab) ou avec le docétaxel (avec ou sans le cétuximab) ou avec 5-FU et le docétaxel (avec ou sans le cétuximab) ou avec le cétuximab et en remplacement du cisplatine, perfusion IV d'une heure tous les 21 jours. AUC= 5 mg.min/mL pour un patient non prétraité et 4 en cas de prétraitement.

Les indications citées ci-dessus sont des cancers de l'adulte. En pédiatrie, le carboplatine prend aussi une place importante. L'efficacité du carboplatine a été démontrée dans les tumeurs cérébrales, les médulloblastomes, les neuroblastomes, les tumeurs germinales malignes et les rétinoblastomes. Des protocoles d'intensification à base de carboplatine sont également utilisés en pédiatrie, notamment dans le traitement de tumeurs cérébrales rares avec des AUCs cibles de l'ordre de 21 mg.min/mL sur 3 jours (protocole AT/RT09).

IV. GENERALITES SUR L'ETOPOSIDE

IV.A. Présentation

L'étoposide (ou VP16) est un dérivé semi-synthétique du podophyllotoxine, un alcaloïde naturel produit par la plante *Podophyllum peltatum* Linnaeus et *Podophyllum emodi* Wallich. Les préparations à base de ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle depuis des siècles. En 1942, Kaplan a découvert que l'application topique de la podophylline (la résine obtenue par l'extrait alcoolique des racines et rhizomes secs de ces plantes) pouvait traiter les condylomes génitaux. Ce travail a mené à la purification et à la détermination structurale des composés contenus dans la résine et a permis l'étude de leurs effets biologiques. Il a été montré que ces composés étaient des inhibiteurs mitotiques puissants (poisons du fuseau) présentant des effets cellulaires ressemblant à ceux de la colchicine, de la griséofulvine et des vinca-alcaloïdes⁹⁸. L'évaluation clinique de certains d'entre eux (dont la podophyllotoxine) a montré une activité antinéoplasique modeste mais une toxicité excessive. Des recherches successives des dérivés moins toxiques ont mené à la synthèse en 1966 de l'étoposide qui présente une augmentation de l'activité antinéoplasique mais n'est pas un poison du fuseau (i.e., il agit sur l'organisation des microtubules qu'aux concentrations beaucoup plus élevées que les concentrations thérapeutiques). Il a été ensuite introduit en essais cliniques au début des années 1970s et sa commercialisation a été approuvée en 1983⁹⁹.

IV.B. Structure

L'étoposide est un composé de formule moléculaire $C_{29}H_{32}O_{13}$ et de masse molaire de 588,6 g/mol. Il est synthétisé à partir de la podophyllotoxine et est différent de celle-ci à trois niveaux (Figure 10): (a) le groupement 4,6-O-éthylidène- β -D-glucopyranoside en position 1 (C-1) du cycle C, (b) épimérisation en position 1 (C-1) du cycle C (épi-configuration) et (c) une fonction hydroxylée (4'-déméthylation) en position 4' (C-4') du cycle E. La stéréochimie du C-2:C-3 trans-lactone est essentielle pour maintenir son activité cytotoxique⁹⁸.

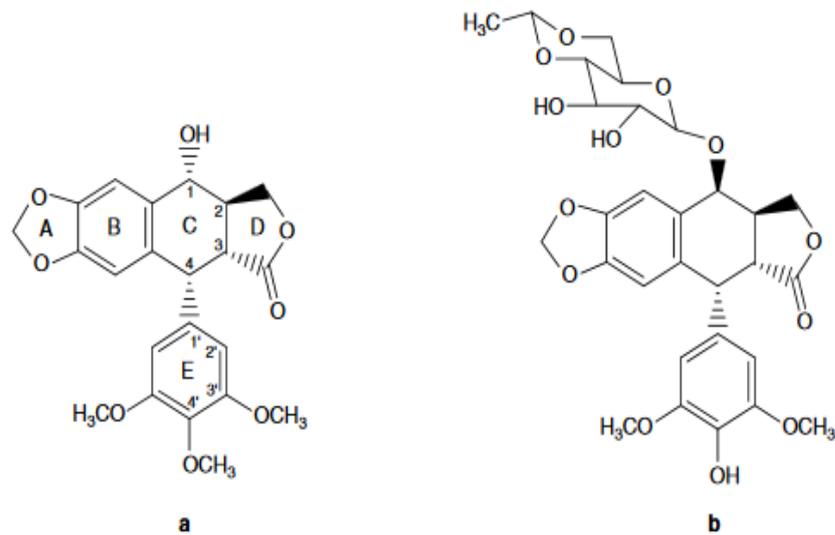


Figure 10. La podophyllotoxine (a) et son dérivé semi-synthétique, etoposide (b).¹⁰⁰

IV.C. Mécanisme d'action cytotoxique

L'étoposide est un cytotoxique phase-dépendant qui a une activité inhibitrice sur une enzyme nucléaire, la topo-isomérase.

En raison de la structure en double hélice de l'ADN, l'ouverture des deux brins lors des processus de transcription, de réplication et de réparation peut entraîner des contraintes topologiques. Les topo-isomérases permettent de résoudre ce problème en ouvrant et refermant la liaison phosphodiester de l'ADN permettant ainsi des transformations topologiques. Selon leur structure et mécanisme d'action, ces enzymes sont subdivisées en type I (Topo I) et type II (Topo II). Topo I agit sur un seul brin de l'ADN et Topo II, sur des deux brins.

L'étoposide agit en inhibant l'activité de la topo II. Cette inhibition entraîne la stabilisation des sites de rupture des deux brins d'ADN catalysés par l'enzyme. Par conséquent, le passage de la cellule à travers la phase S du cycle cellulaire est retardé et le cycle s'arrête totalement à la phase G2^{101,102}. Cette nature « phase-spécifique » de la cytotoxicité de l'étoposide a été bien documentée¹⁰³.

L'interaction entre l'étoposide et la topo II est réversible et la dissociation du complexe ADN-topo II-étoposide permettrait la réparation de l'ADN et de limiter la cytotoxicité du médicament¹⁰⁰. Cette hypothèse pourrait expliquer l'effet de la durée d'exposition sur le degré de mort cellulaire *in vitro*¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ et l'influence du schéma thérapeutique (administration continue) sur l'efficacité du traitement dans certains essais cliniques¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

IV.D. Propriétés pharmacocinétiques

L'étoposide est très peu soluble dans l'eau⁹⁸. Quand il est administré par voie orale, sa demi-vie d'absorption est de 0,2 - 0,4 heures¹¹¹ et la concentration maximale (C_{max}) est atteinte à 0,5 - 4,0 heures¹¹¹⁻¹¹³. La biodisponibilité se situe entre 40% et 90% avec une forte variabilité PK inter- et intra-individuelle¹⁰⁰.

Le volume de distribution à l'état d'équilibre varie entre 3 et 21 L/m².^{110,112,114} Les données précliniques chez les souris ont montré une distribution importante dans les tissus de l'intestin, du foie et des reins comparés à d'autres tissus¹¹⁵. La pénétration de l'étoposide dans le liquide cébrospinal après l'administration intraveineuse est très variable, allant de «non-délectable» à 2,5 µM à 1 - 4 heures après la fin de la perfusion de 100 - 800 mg/m² d'étoposide¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Dans le plasma, l'étoposide se fixe principalement à l'albumine et, de façon moindre, à l'acide alpha-1 glycoprotéine acide. La fraction liée est de 93-98% et dépend des taux d'albuminémie et de bilirubinémie. Elle diminue en cas d'hypo-albuminémie et/ou augmentation de la bilirubinémie¹¹⁹⁻¹²¹.

L'étoposide est métabolisé par le CYP3A4 et CYP3A5 dont l'expression est régulée par NR112 (ou « pregnane X receptor » ou PXR) (Figure 11). En outre, la conversion de l'étoposide en métabolites O-déméthylés (catéchol and quinone) peut aussi être catalysée par la prostaglandine synthase (PTGS) ou la myéloperoxydase (MPO). Ces métabolites sont des inhibiteurs de la topo-isomérase II aussi puissants que la molécule mère et peuvent générer davantage de stress oxydant. Enfin, l'étoposide et ses métabolites peuvent être biotransformés

par la glutathion-S-transférase (GSTT1/GSTP1) et l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT1A1) en métabolites inactifs¹²².

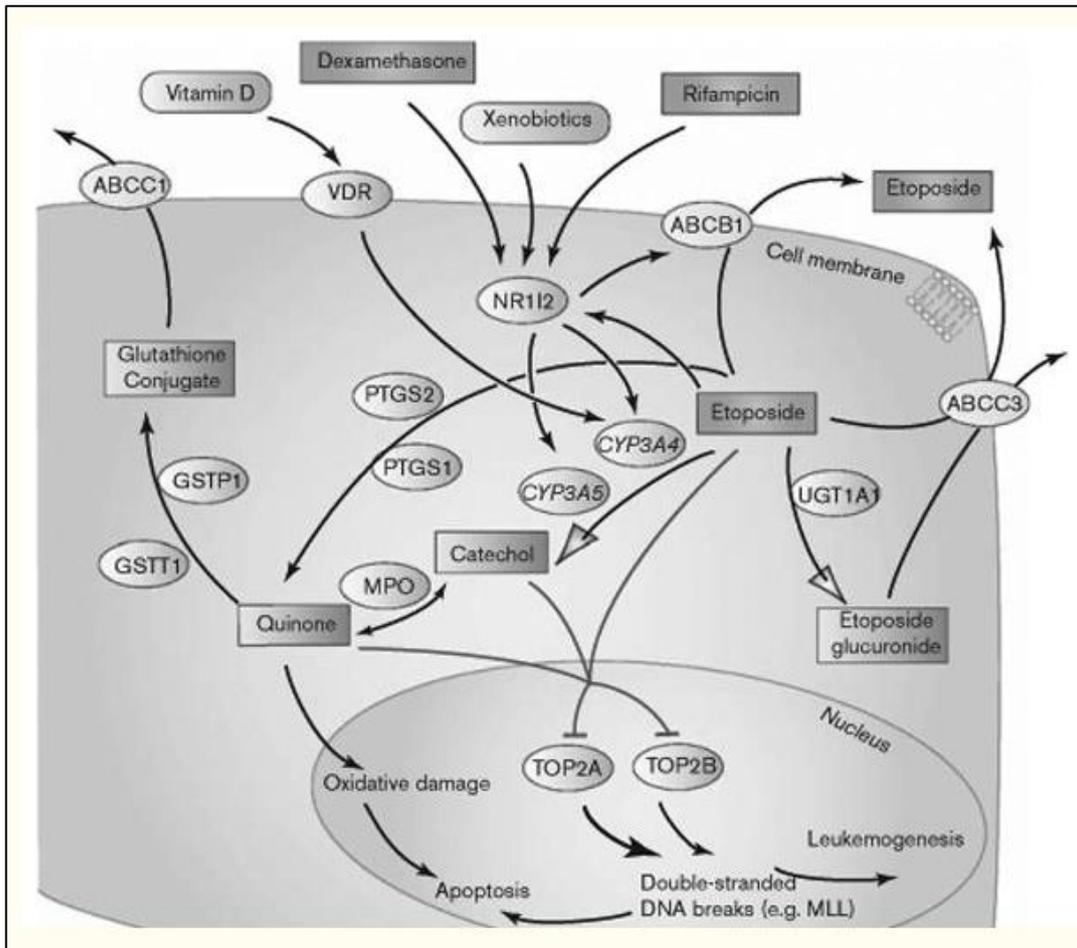


Figure 11.Le transport et le métabolisme de l'étoposide.¹²²

Après l'administration intraveineuse, la décroissance des concentrations de l'étoposide peut être décrite comme un processus biphasique avec une demi-vie de distribution d'environ 1,5 heures et une demi-vie d'élimination terminale de 3 à 12 heures. L'élimination de l'étoposide se fait par excrétion rénale et par métabolisme hépatique. La clairance plasmatique totale varie entre 33 et 48 mL/min [ou 16 à 36 (mL/min)/m²] dont 30% à 67% est représenté par la clairance rénale. Les paramètres d'élimination (la clairance et la demi-vie) sont indépendants de la dose dans un intervalle de 100 à 600 mg/m².^{114,123,124}

IV.E. Méthodes analytiques appliquées en pharmacocinétique

Les concentrations plasmatiques de l'étoposide sont déterminées par différentes méthodes analytiques telles que l'HPLC, chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) ou la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Un détecteur électrochimique, à fluorescence, à ultraviolet ou visible a été utilisé pour ces méthodes de chromatographie liquide. En général, il s'agit de chromatographie en phase inverse avec une phase mobile contenant un tampon ou un mélange de solvants organiques et d'eau. L'étalon interne le plus couramment utilisé est le téniposide mais d'autres composés ont pu être également utilisés (podophyllotoxine, phénacétine, diphenylhydantoïne et lamotrigine). L'étoposide est habituellement extrait par extraction liquide-liquide, mais l'extraction en phase solide a également été décrite. En général, 100 à 500 μL de plasma ou sérum sont nécessaires pour le dosage. Récemment, la détermination des concentrations de l'étoposide à partir d'une goutte de sang séchée (20 μL) a été également développée. Il s'agit de concentrations sanguines totales qui doivent être corrigées par l'hématocrite pour obtenir les concentrations plasmatiques.¹²⁵

IV.F. Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique

Plusieurs études réalisées dans les années 1990s ont mis en évidence la relation entre la PK de l'étoposide et la toxicité hématologique. Certaines d'entre elles ont démontré une corrélation entre la concentration plasmatique à l'état d'équilibre (C_{SS}) d'une perfusion IV de 72 heures ou de 14 jours et la neutropénie^{126,127}.

Dans d'autres études, une corrélation significative entre la concentration minimale à 24 heures ($C_{\min,24h}$) et la neutropénie ou la thrombopénie a été observée. Dans l'étude menée par Grunberg et *al.*,¹²⁸ l'étoposide a été administré par voie orale à une dose 50 mg 2 fois par jour pendant 14 jours toutes les 4 semaines. L'auteur a trouvé que la valeur de $C_{\min,24h} \geq 1,49$ mg/L était associée au nadir des granulocytes inférieur à 500/ μL et $C_{\min,24h} \geq 1,98$ mg/L, au nadir des plaquettes inférieur à 100 000/ μL . Dans deux autres études^{129,130} évaluant une dose orale de 100 mg par jour d'étoposide administré pendant 21 jours tous les 4 semaines, une corrélation significative a été observée entre la neutropénie et la moyenne de $C_{\min,24h}$ aux

jours 8, 15 et 22. La $C_{\min,24h} > 0,3$ mg/L était associée à une myélosuppression plus sévère. Miller et al.¹³¹⁻¹³³ ont montré également qu'une valeur de $C_{\min,24h}$ supérieure à ce seuil était associée à une neutropénie de grade 3 ou 4 chez les patients recevant 50 mg/m²/jour de l'étoposide par voie orale pendant 21 jours toutes les 4 semaines. Cependant, d'autres études n'ont trouvé aucune corrélation entre les concentrations de l'étoposide et la toxicité hématologique¹³⁴⁻¹³⁶.

Enfin, une corrélation entre l'AUC de l'étoposide et la neutropénie a également été démontrée¹³⁷⁻¹³⁹. Dans l'une de ces études¹³⁷, un modèle E_{\max} (effet maximal)-sigmoïde a été utilisé pour décrire la relation entre l'AUC de l'étoposide du jour 1 et la neutropénie (en pourcentage de diminution du nombre absolu de neutrophiles) dans un schéma d'administration de 100 mg/jour par voie orale pendant 15 jours. L'auteur a défini une valeur seuil de l'AUC de 2 mg.min/mL au-dessus de laquelle une neutropénie de grade 3 ou 4 a été observée. Certains travaux ont par ailleurs observé une meilleure corrélation entre les paramètres PK (AUC, $C_{\min,24h}$) de l'étoposide libre (non lié aux protéines plasmatiques) et la toxicité hématologique que ceux de l'étoposide plasmatique totale^{140,141}.

En ce qui concerne l'efficacité du traitement, un nombre limité d'études ont montré une relation entre la PK et la réponse tumorale ou la survie. Slevin et al.¹⁰⁷ ont comparé l'efficacité de deux schémas d'administration (perfusion IV de 24 heures de dose unique *versus* schéma habituel : perfusion IV de 2 heures pendant 5 jours consécutifs) chez les patients atteints de cancer du poumon à petites cellules. Ils ont observé que la durée d'exposition à une concentration d'étoposide > 1 mg/L était associée à l'activité anti-tumorale. Dans une autre étude où 100 mg d'étoposide a été administré *per os* pendant 21 jours toutes les 4 semaines, une différence statistiquement significative ($p=0,017$) a été observée entre $C_{\min,24h}$ moyenne des répondeurs et des non-répondeurs (0,37 mg/L *versus* 0,21 mg/L)¹³⁰.

En 2008, You et al.¹⁴² ont démontré une corrélation significative entre la clairance et l'AUC de l'étoposide et la survie globale des patients atteints du cancer des poumons à petites cellules. L'étoposide a été administré à une dose de 120 mg/m² par perfusion IV de 30 min pendant 3 jours en association avec doxorubicine-ifosfamide ou des dérivés de platine. L'auteur a observé, par des analyses multi-variées, que la clairance de l'étoposide $\leq 2,22$ L/h et l'AUC $> 254,8$ mg.h/L étaient significativement et indépendamment corrélées avec une survie globale plus longue.

IV.G. Individualisation de doses

Plusieurs études ont été publiées à propos de l'individualisation de dose de l'étoposide basée sur les caractéristiques des patients. En cas d'insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine ≤ 30 mL/min), une diminution de dose d'environ 30% pourrait permettre de corriger l'augmentation de l'AUC et d'obtenir un niveau d'exposition similaire aux patients avec une fonction rénale normale¹⁴³.

En cas d'insuffisance hépatique, il est important de tenir compte de l'impact de l'albuminémie et de la bilirubinémie sur la pharmacocinétique de l'étoposide. En effet, l'étoposide se fixe principalement à l'albumine et il a été montré que la bilirubine sérique influence cette fixation, probablement, par déplacement de la liaison. Une augmentation des concentrations libres de l'étoposide a été observée chez les patients insuffisants hépatiques en raison d'une diminution des sites de liaison due à l'hypoalbuminémie. En cas d'hyperbilirubinémie chez ces patients, l'exposition à l'étoposide libre est également augmenté en raison de l'augmentation de la fraction libre et la diminution concomitante de la clairance de l'étoposide libre¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Une réduction de dose d'au moins 30% chez ces patients est essentielle pour prévenir une augmentation de toxicité¹²³.

En dehors de ces recommandations, une analyse PK-pop¹⁴⁷ a été réalisée pour évaluer l'effet de différentes covariables sur les paramètres PK de l'étoposide total et libre. Une formule a été établie associant la clairance plasmatique totale de l'étoposide au taux d'albuminémie, au taux de protéine totale, à la créatininémie, au poids et à la présence ou non de métastases hépatiques. La clairance de l'étoposide libre était négativement corrélée à la créatininémie mais, par contre, ne dépendait pas du taux de protéinémie ou d'albuminémie. Ce modèle de PK-pop indique que la fonction rénale est le seul facteur à prendre en compte pour le choix de dose, au moins chez une population de fonction hépatique normale¹⁴⁷.

Le TDM a été beaucoup évalué pour l'administration orale répétée de l'étoposide en raison de la forte variabilité de l'exposition due à sa faible biodisponibilité¹⁰⁰. Cependant, son schéma d'administration en perfusion continue sur plusieurs jours facilite aussi la mise en place de cette pratique. Ratain et al.¹²⁶ ont été le premier à évaluer l'intérêt de l'adaptation de dose de l'étoposide (administré en perfusion continue de 72 h) basée sur la C_{ss} à 24 h après le début de la perfusion. La dose a été augmentée de 375 à 459 mg/m²/jour sans augmenter la toxicité,

ce qui pourrait se traduire en une augmentation de l'effet antitumoral. Joel et *al.*¹⁴⁸ ont évalué le TDM chez 2 cohortes de patients atteints du cancer du poumon à petites cellules recevant l'étoposide en monothérapie en perfusion continue sur 5 jours, toutes les 3 semaines. La première cohorte (15 patients) a débuté le traitement par l'étoposide à 2 µg/mL, avec une escalade de dose à 3 µg/mL pour les cycles 3 et 4 et à 4 µg/mL pour les cycles 5 et 6 (si la toxicité est tolérable). La seconde (34 patients) a commencé à 3 µg/mL, avec une escalade de dose à 4 et 5 µg/mL aux cycles 3 et 5 respectivement. Les concentrations de l'étoposide ont été monitorées à 18 heures et 66 heures après le début de la perfusion pour permettre l'adaptation de dose. Les auteurs ont observé que la variabilité interindividuelle était significativement réduite et que dans la seconde cohorte, la distribution des grades de neutropénie du premier cycle était beaucoup plus proche de la distribution Normale par rapport aux autres études de l'étoposide en monothérapie de leur établissement.

En 1993, Strömngren et *al.*¹⁴⁹ ont développé une stratégie de prélèvements limités pour estimer l'AUC de l'étoposide par une régression linéaire multiple. L'étoposide a été administré à la dose de 100 mg/m² en perfusion IV de 90 min en association avec le carboplatine. L'AUC était corrélée avec les concentrations à 5 min, 4 h et 21 h après la fin de la perfusion. Ensuite, la méthode a été prospectivement évaluée et la précision de l'estimation était de 13,4%, 10,8%, et 9,0% pour le modèle à un, deux, et trois temps de prélèvement respectivement. En 1999, Tranchand et *al.*¹⁵⁰ ont évalué et validé l'estimation des paramètres PK de l'étoposide par l'approche bayésienne à partir de 3 prélèvements (à la fin de la perfusion, 5 h et 24 h après le début de la perfusion). L'estimation de la clairance a été associée à un faible biais (-1,72%) et une bonne précision (environ 16%).

Ciccolini et *al.*¹⁵¹ ont évalué un TDM basé sur une analyse bayésienne pour l'étoposide administré en perfusion continue pendant 5 jours chez 25 patients (47 cycles). L'analyse bayésienne a été réalisée au jour 2 à partir de 3 concentrations (1h, 12h et 24 h après le début de la perfusion) et des valeurs de population des paramètres obtenus d'une population de référence (14 patients sans aucune adaptation de dose). La dose a été adaptée aux jours 4 et 5 selon les valeurs individuelles de paramètres pour atteindre une C_{ss} cible. Ils ont montré que la C_{ss} était dans l'intervalle de ±15% de la C_{ss} cible dans 77% des cycles par rapport à seulement 36% chez la population de référence. La comparaison des résultats cliniques entre

les 2 groupes de patients pourrait permettre d'évaluer l'intérêt du TDM. Malheureusement, elle n'a pas été effectuée dans cette étude.

IV.H. Indications

Les indications les plus courantes seront présentées dans cette partie selon le thésaurus Oncompip (version 2009, 2013, 2014 et 2016) et le thésaurus des chimiothérapies de l'Institut Claudius-Regaud (Version 2017).

✓ *Uro-génital*

❖ Cancer testiculaire :

- En association avec la bléomycine et le cisplatine (protocole BEP), perfusion IV de 100 mg/m²/jour pendant 5 jours tous les 21 jours pendant 3 cycles pour les patients de bon pronostic et 4 cycles pour ceux de pronostic intermédiaire. Ce protocole peut être précédé par l'administration du taxol et suivi de celle de l'oxaliplatine au jour 10 (protocole T-BEP-Oxali) pour les patients qui ne répondent pas suffisamment au 1^{er} cycle de BEP.
- En association avec l'ifosfamide et le cisplatine, perfusion IV de 75 mg/m²/jour pendant 5 jours (traitement de 2^{ème} ligne) tous les 21 jours, protocole VIP.
- En association avec le carboplatine (AUC=6 mg.min/mL), en perfusion IV de 100 mg/m²/jour pendant 5 jours tous les 21 jours.

❖ Tumeur germinales métastatiques réfractaires ou en rechute :

- Intensification Motzer (protocole TICE) : en association avec le carboplatine, perfusion IV (d'une heure) 3 jours de suite pendant 3 cycles précédés par 2 cycles de paclitaxel et ifosfamide.

✓ *Pneumologie*

❖ Cancer du poumon à petites cellules :

- En association avec le carboplatine (AUC=5 ou 4 mg.min/mL), perfusion IV de 2 heures de 100 à 120 mg/m²/jour pendant 3 jours tous les 21 jours pendant 3 à 6 cycles.

✓ *Hématologie*

❖ Lymphome de Hodgkin :

- En association avec le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine, la bléomycine et la procarbazine, perfusion IV de 200 mg/m²/jour pendant 3 jours tous les 21 jours ; protocole BEACOPP.

❖ Lymphomes non-Hodgkinien (lymphomes T, lymphomes digestifs, complication neurologique ou sujets > 75 ans) :

- En association avec le rituximab, le cyclophosphamide, la doxorubicine et en remplacement de la vincristine, perfusion IV de 100 mg/m² au jour 1 tous les 21 jours ; protocole (R)-CHVP.

❖ Lymphomes cérébraux :

- En association avec le rituximab, la vincristine, le méthotrexate et la procarbazine, perfusion IV de 100 mg/m²/jour au jour 1 (+/- jour 3) tous les 28 jours ; protocole R-MPVA +/- VP16.

❖ Lymphomes agressifs en rechute

- En association avec le rituximab, le carboplatine (AUC=5 mg.min/mL), l'ifosfamide, en perfusion IV de 100mg/m²/jour pendant 3 jours tous les 21 jours ; protocole (R)-ICE.

❖ Lymphome de Burkitt :

- En association avec la cytarabine, perfusion IV de 2 heures de 200mg/m²/jour du jour 2 au jour 5 du cycle ; protocole CYVE.

❖ Maladie de Castelman :

- En association avec le rituximab, en perfusion IV de 120 mg/m² au jour 1 (+/- jour 2 dans les formes sévères) puis 100 mg/m² *per os* aux jours 11, 18 et 25 ; protocole R-VP16.

❖ Syndrome d'activation macrophagique :

- En monothérapie, perfusion de 150 mg/m² pendant 2 jours.

✓ *Sarcomes*

❖ Sarcome d'Ewing :

- En association avec la vincristine, l'ifosfamide, la doxorubicine, perfusion IV de 2 heures de 150 m/m²/jour pendant 3 jours consécutifs tous les 21 jours ; protocole VIDE.

Travaux personnels

Objectifs

Les tumeurs germinales testiculaires sont une forme rare de cancer touchant particulièrement les hommes jeunes entre 15 et 40 ans¹⁵². La majorité de ces tumeurs sont d'origine gonadique alors qu'environ 5% proviennent des sites à l'extérieur des gonades tels que le rétropéritoine, le médiastin ou le cerveau¹⁵³. Suite à la découverte du cisplatine, le taux de guérison des tumeurs germinales a été amélioré (se trouvant entre 90%-95%) et contrairement à la plupart des tumeurs solides, environ 80% des patients peuvent être guéris aux stades métastatiques^{153,154}. Ces formes métastatiques peuvent être traitées par 3-4 cycles de polychimiothérapie associant la bléomycine, l'étoposide, et le cisplatine (protocole BEP). Le taux de guérison se trouve entre 41% pour les patients du groupe de mauvais pronostic et 92% pour ceux du groupe de bon pronostic¹⁵⁵. En cas de tumeur réfractaire ou en rechute, les chimiothérapies à base de cisplatine aux doses conventionnelles¹⁵⁶⁻¹⁶¹ sont parmi les options thérapeutiques avec un taux de réponse qui varie entre 20% et 60% pour les patients présentant des caractéristiques dites " favorables ". En revanche, les patients avec des caractéristiques non favorables répondent rarement à ces protocoles de rattrapage¹⁶². Ces résultats ont incité les chercheurs à réaliser des études évaluant l'efficacité des protocoles de haute dose chez ces patients. Dans ces protocoles, le carboplatine a été utilisé à la place du cisplatine en raison de toxicités sévères non-hématologiques (néphro- et ototoxicité) de ce dernier. Parmi les études réalisées, celles de l'équipe de Motzer (du Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)¹⁶³⁻¹⁶⁵ ont montré l'intérêt du protocole TICE présentant un résultat de survie globale de plus de 50%. Le protocole de haute dose évalué est constitué de 2 cycles de paclitaxel (T) et d'ifosfamide (I) suivi de 3 cycles (de 3 jours consécutifs) d'intensification de dose de carboplatine (C) et d'étoposide (E) avec support de cellules souches périphériques. Cependant, une forte variabilité interindividuelle de l'exposition au carboplatine a été observée et ce, malgré la prise en compte *a priori* de la variabilité interindividuelle d'ordre PK [i.e., prédiction de la CL_{UF} par la formule de Calvert où le DFG a été mesuré grâce à une scintigraphie rénale après injection de ^{99m}Tc-DTPA (pentétate de technétium)¹⁶³ ou estimé par l'équation de Jelliffe¹⁶⁴]. En effet, au palier de l'AUC recommandé de 24 mg.min/mL, les

AUC mesurées chez les patients étaient comprises entre 12 et 48 mg.min/mL pour la première étude¹⁶³ et entre 10,9 et 36,7 mg.min/mL pour la deuxième¹⁶⁴.

Notre essai TICE était une étude clinique de phase II réalisée dans huit hôpitaux de France. Il avait pour objectif principal d'évaluer l'efficacité du protocole TICE dans le traitement de tumeurs germinales réfractaires ou en rechute de mauvais pronostic, pour lequel la dose de carboplatine était plus adéquatement adaptée au moyen d'un TDM. Ce TDM a consisté à adapter la dose du jour 3 en fonction de la CL_{UF} observée au jour 1 afin d'atteindre l'AUC cible totale sur 3 jours de 24 mg.min/mL. Cette CL_{UF} observée est déterminée à partir de trois concentrations ultrafiltrables (UF) par analyse bayésienne.

Ces travaux de thèse ont consisté, premièrement, à évaluer la performance de cette méthode d'adaptation de doses de carboplatine basée sur un TDM et, à partir des données accumulées, à la comparer aux méthodes alternatives d'adaptation de posologie du carboplatine (méthodes *a priori* basées sur les caractéristiques des patients). Nous avons évalué les équations déjà publiées (et utilisées) pour prédire la clairance individuelle du carboplatine et avons évalué la pertinence de développer une nouvelle équation spécifique à ces patients. En particulier, nous avons prolongé les travaux basés sur les taux plasmatiques de Cystatine C, une protéine endogène éliminée par filtration glomérulaire, qui pourrait permettre d'améliorer la prédiction de la clairance du carboplatine.

De façon complémentaire, afin de faciliter la généralisation du TDM du carboplatine, nous avons évalué la possibilité de maîtriser l'exposition en carboplatine ultrafiltrable (forme plasmatique active dont l'obtention des concentrations dispense de l'étape d'ultrafiltration pas toujours réalisable dans toutes les structures de soin) par le seul monitoring des concentrations plasmatiques (totales). En analysant les données (concentrations totales et UF) des patients de cet essai clinique TICE et celles d'une autre étude réalisée précédemment correspondant à des doses standards de carboplatine, nous avons développé deux méthodes pour estimer la CL_{UF} : l'une entièrement basée sur la méthodologie de PK-pop, l'autre basée sur la corrélation entre clairance plasmatique totale (CL_{PL}) et CL_{UF} .

Deuxièmement, une exploration pharmacogénétique a été réalisée pour étudier l'impact du polymorphisme génétique sur la toxicité auditive du carboplatine. Si l'ototoxicité est bien connue pour le cisplatine, elle n'est pas habituellement observée pour le carboplatine utilisé

aux doses standards. En revanche, elle constitue la toxicité dose-limitante des protocoles de hautes doses de carboplatine¹⁶⁶⁻¹⁶⁹.

La troisième partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude pharmacocinétique de l'étoposide dans le cadre du protocole TICE pour lequel les doses sont calculées en fonction de la BSA (400 mg/m²/jour aux jours 1, 2 et 3). Différents travaux, dans d'autres indications, ont montré l'intérêt de l'adaptation individuelle de posologie, en particulier chez les patients présentant une insuffisance rénale. Le résultat des analyses permettra d'évaluer si une adaptation *a priori* de dose basée sur les caractéristiques du patient ou éventuellement la réalisation d'un TDM se justifient pour le protocole TICE. L'implication de différents facteurs génétiques correspondant à la pharmacologie de l'étoposide sur des marqueurs pharmacodynamiques (réponse tumorale et toxicité) a été également étudiée.

I. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES DU CARBOPLATINE

I.A. Apport du TDM dans la maîtrise de l'AUC du carboplatine

I.A.1. Article n°1

Ces travaux ont été publiés dans le journal « Clinical Cancer Research (CCR) » : Moeung et al., 2017 Dec 1; 23(23):7171-7179

Therapeutic Drug Monitoring of Carboplatin in High-Dose Protocol (TI-CE) for Advanced Germ Cell Tumors: Pharmacokinetic Results of a Phase II Multicenter Study



Sotheara Moeung^{1,2}, Christine Chevreau¹, Sophie Broutin³, Jérôme Guitton⁴, Bénédicte Lelièvre⁵, Joseph Ciccolini⁶, Christophe Massart⁷, Aude Fléchon⁸, Rémy Delva⁹, Gwenaëlle Gravis¹⁰, Jean-Pierre Lotz¹¹, Jacques-Olivier Bay¹², Marine Gross-Goupil¹³, Angelo Paci³, Sabrina Marsili^{1,2}, Laurence Malard¹, Etienne Chatelut^{1,2}, and Fabienne Thomas^{1,2}

Abstract

Purpose: We aimed to evaluate the performance of therapeutic drug monitoring (TDM) approach in controlling interpatient variability of carboplatin exposure (AUC) in patients treated with TI-CE high-dose chemotherapy for advanced germ cell tumors and to assess the possibility of using a formula-based dosing method as a possible alternative.

Experimental Design: Eighty-nine patients receiving carboplatin for 3 consecutive days during 3 cycles were evaluable for pharmacokinetic study. Blood samples were taken on day 1 to determine the carboplatin clearance using a Bayesian approach (NONMEM 7.2) and to adjust the dose on day 3 to reach the target AUC of 24 mg·min/mL over 3 days. On days 2 and 3, samples were taken for retrospective assessment of the actual AUC. A population pharmacokinetic analysis was also performed on 58 patients using NONMEM to develop a covariate

equation for carboplatin clearance prediction adapted for future TI-CE patients, and its performance was prospectively evaluated on the other 29 patients along with different methods of carboplatin clearance prediction.

Results: The mean actual AUC was 24.4 mg·min/mL per cycle (22.4 and 26.8 for 10th and 90th percentiles, respectively). The new covariate equation $[CL (mL/min) = 130.7 \times (Scr/83)^{-0.826} \times (BW/76)^{+0.907} \times (Age/36)^{-0.223}]$ with Scr in $\mu\text{mol/L}$, BW in kilograms, age in years] allows unbiased and more accurate prediction of carboplatin clearance compared with other equations.

Conclusions: TDM allows controlling and reaching the target AUC. Alternatively, the new equation of carboplatin clearance prediction, better adapted to these young male patients, could be used if TDM cannot be implemented. *Clin Cancer Res*; 23(23); 1–9. ©2017 AACR.

Introduction

High-dose (HD) chemotherapy and stem-cell rescue have been evaluated in salvage treatment (first or second salvage) or in first-line treatment in the poor-risk group of advanced germ cell tumors according to the International Germ Cell Cancer Collab-

orative Group. In 2000, Motzer and colleagues demonstrated the benefit of dose-intensified chemotherapy scheme (TI-CE high-dose chemotherapy) with peripheral blood-derived stem-cell (PBSC) support in patients who failed to conventional-dose salvage treatment (1). This TI-CE regimen combines two cycles of paclitaxel plus ifosfamide followed by three cycles of HD carboplatin and etoposide. Substitution of cisplatin by carboplatin allowed dose escalation as toxicity profile of carboplatin is more favorable. Einhorn and colleagues (2) retrospectively analyzed HD as third-line treatment in patients with metastatic germ cell tumors for which both etoposide and carboplatin daily doses were calculated according to body surface area (BSA; i.e., 750 and 700 mg/m^2 , respectively).

After a first clinical trial evaluating HD regimen in first-line therapy for patients with poor-risk germ cell tumors for which carboplatin dose was also calculated according to BSA (total dose of 1,800 mg/m^2 ; ref. 3), Motzer and colleagues adopted AUC dosing for carboplatin. They performed a phase I trial consisting of several levels of carboplatin target total AUC (i.e., corresponding to the sum of 3 daily administrations) from 12 to 32 mg·min/mL using the Calvert formula based on a glomerular filtration rate (GFR) measured with radionuclide-labeled ligand technetium-99m DTPA plasma clearance to calculate the dose (1). Despite this individualization of the carboplatin dose, the mean

¹Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France. ²CRCT, Université de Toulouse, Inserm, Toulouse, France. ³Institut Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Service de pharmacologie, Villejuif, France. ⁴Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Lyon, France. ⁵Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Angers, France. ⁶CHU La Timone, Marseille, France. ⁷Institut Gustave Roussy, Oncologie Médicale, Villejuif, France. ⁸Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁹Institut De Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Angers, France. ¹⁰Institut Paoli Calmettes, Marseille, France. ¹¹Hôpital Tenon, Paris, France. ¹²CHU Clermont Ferrand, France. ¹³Hôpital Saint André, Bordeaux, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Etienne Chatelut, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, 1 Avenue Irène Joliot-Curie, F-31059 Toulouse, France. Phone: 33-5-31-15-52-50; Fax: 33-5-31-15-52-38; E-mail: chatelut.etienne@iuct-oncopole.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1344

©2017 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Therapeutic drug monitoring (TDM) does not represent a routine practice for cytotoxic drugs due to their usual schedule of administration (i.e., day 1–day 21 schedule), which does not allow a dose adjustment within a cycle. Carboplatin is intensified in the TI-CE regimen for germ cell cancer treatment in order to reach a 24 mg.min/mL target AUC over 3 days. The results of this prospective pharmacokinetic clinical study demonstrate the feasibility and the benefit of conducting TDM to control carboplatin plasma exposure to accurately reach the target AUC in patients treated with this high-dose regimen. Moreover, we propose a new formula of carboplatin clearance prediction more adapted to these particular young male patients than the Calvert formula using Cockcroft–Gault for glomerular filtration rate estimation. This new equation (based on age, body weight, and serum creatinine) can be used as a putative alternative in cases where TDM cannot be implemented.

measured AUC in patients included at the 24 mg.min/mL AUC level was lower than the target and displayed a high variability with observed AUCs ranging from 12 to 48 mg.min/mL. Therefore, Kondagunta and colleagues (4) conducted a second trial in which the GFR was calculated with the Jelliffe's equation based on serum creatinine (Scr), age, and BSA. The value of 24 was chosen as recommended target total AUC, but the mean observed AUC for this level was 21.6 mg.min/mL, with values ranging from 10.9 to 36.7 mg.min/mL. Given the toxicity (i.e., ototoxicity and hematotoxicity) of this HD regimen (5, 6), we first performed a pilot monocenter study in 5 patients (15 cycles) showing the feasibility to control individual carboplatin total AUC using therapeutic drug monitoring (TDM) performed at day 1: the measured total AUC ranged between 24.0 and 26.5 for a target value of 24 mg.min/mL (7). The present TI-CE trial was a national multicenter phase II trial aiming to evaluate the efficacy (primary endpoint) and tolerance of the TI-CE protocol in the treatment of previously treated germ cell tumors in male adult patients. The particularity of this trial is the individualization of carboplatin dose according to TDM in order to reach the target AUC of 24 mg.min/mL. The main objective of the present pharmacokinetic (PK) study was to evaluate the performance of this TDM approach in controlling interpatient variability of carboplatin exposure as well as its feasibility to be conducted at a multicenter level. Secondly, we also aimed to assess the possibility of using a formula-based dosing method as an alternative to the practice of TDM. To this end, we developed and evaluated a covariate model adapted to this specific population of patients based on patient characteristics which are known to influence carboplatin clearance (Scr, body weight, age, and sex) and additionally serum cystatin C (CysC) which has recently been demonstrated to be a marker of carboplatin elimination (8, 9).

Patients and Methods

Patients and treatment

The trial (ClinicalTrials.gov reference number NCT00864318) was approved by the ethical committee of Toulouse. The treatment consisted of two cycles (14 days apart) of paclitaxel

(200 mg/m², D1 over 24 hours) plus ifosfamide (2g/m²/d D2 to D4) and mesna protection. Leukapheresis for PBSC collection started at day 11 and was done for 3 consecutive days. Patients who mobilized more than a total of 9×10^6 CD34⁺ cells/kg did not undergo a second cycle of paclitaxel/ifosfamide. These two cycles of paclitaxel/ifosfamide were followed by three cycles (14- to 21-day intervals) of HD carboplatin (total AUC over 3 days of 24 mg.min/mL) and etoposide (400 mg/m²) given for 3 consecutive days in each cycle with PBSC support. For the PK study and throughout this article, the HD cycles are named C1, C2, and C3.

In total, 101 male patients with relapsed or refractory germ cell tumors were enrolled in 8 different centers in France, and informed consent was obtained from each patient. Twelve patients were not considered for the PK study due to informed consent withdrawal or premature termination of treatment before carboplatin/etoposide cycles on account of unsupported toxicity, disease progression, or death.

Clinical outcome and toxicity will be reported in detail in a separate manuscript.

Carboplatin administration, blood sampling and platinum analysis

In each cycle, carboplatin was administered as a daily 1-hour infusion in 5% dextrose for 3 consecutive days. For each carboplatin administration, three blood samples were collected at 5 minutes before the end of infusion, and 1 and 4 hours after the end of infusion. The three samples were selected according to a limited sampling strategy developed previously (10). After immediate centrifugation of the blood samples at 1,500 g for 10 minutes at 4°C, 1 mL of plasma was taken and then ultrafiltered (centrifugation at 4°C for 15 minutes at 1,500 g) using the Amicon MPS1 micropartition system with YM-T membrane. Carboplatin levels in the plasma ultrafiltrate (UF) obtained at day 1 of each cycle were measured by means of flameless atomic absorption spectrophotometric analysis according to a previously described method (11) in six different hospital laboratories. A cross-validation procedure was done before the start of the study. The mean coefficients of variation using three spiked plasma UF control samples with nominal values of 0.0525, 1.575, and 31.5 mg/L were 6.1%, 6.5%, and 7.2%, respectively. Each laboratory obtained a value within the interval of $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, and $\pm 10\%$ for the low-, medium-, and high-level control sample, respectively. These intervals were those used for validation of each run in each laboratory. The determination of carboplatin UF concentrations corresponding to samples obtained at days 2 and 3 of the 3 cycles was centralized in the Institut Claudius-Regaud laboratory.

Of note, these PK samples will also be used to determine etoposide concentrations in order to perform a PK analysis of this drug given in the HD setting. These results will be reported in a future manuscript.

Carboplatin dose adaptation and PK analyses

The initial carboplatin dose (day 1 and day 2 of cycle 1 HD: C1D1 and C1D2) was calculated as follows: $8 \times \text{CLp}$ where 8 is the daily target AUC (target total AUC divided over 3 days) and CLp is the predicted carboplatin clearance calculated with an equation previously published by our team (8): $\text{CLp (mL/min)} = 110 \times (\text{Scr}/75)^{-0.654} \times (\text{BW}/65)^{+0.625} \times (\text{age}/56)^{-0.507}$ with Scr in $\mu\text{mol/L}$, body weight (BW) in kilograms, and age in years. Although this previous work showed the benefit of including

CysC in the equation for CL_p prediction, we could not use the equation including CysC because the CysC measurement was not implemented in some centers participating in the trial. We then used the alternative equation without CysC. To limit the risk of overdosing patients, a value of predicted carboplatin clearance of 200 mL/min was set as the superior boundary as this value is close to the largest value observed in our previous multicenter study (i.e., 229 mL/min; ref. 9). Consequently, the maximum daily dose to be administered on C1D1 and C1D2 was 1,600 mg.

Actual carboplatin CL on C1D1 was obtained by Bayesian approach using the NONMEM program (version 7, level 2.0) according to a two-compartment PK model and first-order conditional estimation method with interaction (FOCE-I) as previously described in detail (8). No covariates were considered for the typical value of CL; the data of each patient (i.e., 3 UF carboplatin concentrations and dose) were combined with those of a database composed of 143 patients with rich sampling (10, 12) and 45 other patients with limited sampling (ref. 8; i.e., without implementing the dataset during the clinical trial). Individual values of clearance (CL_{D1}) were obtained for each patient. The carboplatin dose of day 3 of cycle 1 (C1D3) was adjusted to obtain a total target AUC of 24 based on the hypothesis that carboplatin CL was constant over the 3 days of the cycle:

$$\text{Dose}_{D3} (\text{mg}) = [24 - (\text{Dose}_{D1} + \text{Dose}_{D2}) / \text{actual CL}_{D1}] \times \text{actual CL}_{D1}.$$

For the subsequent cycles of treatment, the AUC of 24 mg·min/mL remained the target AUC if no major ototoxicity had been observed; otherwise, the target AUC was reduced to 18 mg·min/mL. The first dose was calculated using the day 1's actual CL of the preceding cycle, and the same procedure of dose adaptation on D3 based on analysis of D1 concentrations was conducted.

Overall PK Analysis

After the completion of treatment of all the patients, analysis of whole PK data (3 cycles of 3 days) was performed with three objectives: (i) to measure the actual total AUC and compare it with target AUC; (ii) to quantify the inpatient PK variability corresponding to carboplatin CL; and (iii) to perform a covariate analysis in order to evaluate the possibility of proposing an equation to predict carboplatin CL in patients with germ cell tumors as a putative substitute to TDM to individualize carboplatin dose.

Determination of total measured AUC

Bayesian estimation of carboplatin CL was performed retrospectively for days 2 and 3 of the 3 cycles according to the method used for TDM at day 1 of each cycle. Actual total AUC for each cycle was obtained by the sum of daily AUC calculated by dividing each daily carboplatin dose by the corresponding carboplatin CL.

Study of inpatient PK variability

The inpatient variability (intra- and intercycle effects) was first assessed by performing a PK analysis of the whole dataset (89 patients at C1, 80 at C2, and 72 at C3, 3 cycles, 3 days per cycle) including interoccasion variability (IOV) in order to determine cycle-to-cycle and day-to-day variability. The model description is provided in Supplementary Data S1. Secondly, in order to evaluate the clinical relevance of the inpatient variability, a statis-

tical analysis was performed on the individual carboplatin CL values obtained on each day using a mixed-effects model for repeated measures and testing the contrasts of the marginal linear predictions for the effect of days within cycles and the effect of cycles at days 1, 2 and 3.

Covariate analysis

Based on our previous work (9), the four covariates used for the prediction of carboplatin CL (i.e., Scr, BW, age, CysC level) were evaluated according to allometric equations: $\text{TVCL} = \theta_1 \times (\text{Scr} / \text{mean Scr})^{0.2} \times (\text{CysC} / \text{mean CysC})^{0.3} \times (\text{BW} / \text{mean BW})^{0.4} \times (\text{Age} / \text{mean Age})^{0.5}$.

CysC plasma was measured from a frozen serum sample by an automated particle-enhanced nephelometric immunoassay at the Institut Claudius-Regaud. The analyzer (BN ProSpec), as well as the controls, standards, and kits (N Latex CysC) were provided by Siemens.

Because CysC was not available in 2 patients, the analysis was performed on 87 patients. Data-splitting was done randomly to create a model-building dataset (58 patients) and a model-validation dataset (29 patients). Only data of C1D1 of the model-building dataset were considered for the covariate analysis. A stepwise backward elimination of each covariate from the full equation was then performed to test its influence on carboplatin clearance. Full and reduced models (one parameter less) were compared by the Khi-2 test of the difference between their respective objective function values (OFV). OFV is equal to minus twice the log likelihood of the data. This value is an indicator of the goodness-of-fit of the model. An increase of at least 3.84 ($P < 0.05$, one degree of freedom) was required to consider the covariate as having significant impact on carboplatin clearance.

The predictive performance of the covariate equations obtained from the above covariate analysis was prospectively assessed using the model-validation dataset ($n = 29$ patients) for each cycle of treatment. For the j th patient, the relative prediction error [pe_j(%)] for carboplatin CL was calculated with the following equation: $\text{Pe}_j (\%) = (\text{CL}_{\text{pred}} - \text{CL}_{\text{actual}}) \times 100 / \text{CL}_{\text{actual}}$, where CL_{actual} is the observed value obtained by Bayesian estimation and CL_{pred} is the value of predicted CL from: (i) covariate equations, (ii) the widely used Calvert formula (13) where Cockcroft-Gault or Jelliffe CL_{CR} was used as a surrogate for the GFR, or (iii) the modified Thomas formula which integrates CysC (9). The mean percentage error [MPE = $N^{-1} \cdot \sum_{j=1}^N (\text{pe}_j)$, where N is the number of patients] and the mean absolute percentage error [MAPE = $N^{-1} \cdot \sum_{j=1}^N |\text{pe}_j|$] was computed as a measure of bias and precision, respectively. For statistical analyses, MPE values were compared with the theoretical value of 0 with the Student t test. Linear regression was performed between the actual CL and the CL values predicted according to the formulas stated above.

Results

HD chemotherapy and carboplatin dose modifications

The main characteristics of the 89 patients are shown in Table 1. Among these 89 patients, 72 patients (81%) received 3 cycles of HD chemotherapy combining carboplatin and etoposide, 9 patients (10%) received only 2 cycles, and 8 patients (9%) received 1 cycle.

Table 2 shows the mean daily dose and the mean total dose per cycle of carboplatin that were administered to the patients. The initial dose (days 1 and 2 of cycle 1) was capped to 1,600 mg for

Moeung et al.

Table 1. Baseline demographic and laboratory characteristics of the 89 male patients of the PK study

Characteristics mean (range)	Whole dataset (n = 89)	Model-building dataset (n = 58) ^{a,b,c}	Prospective dataset (n = 29) ^{a,b,c}
Age (years)	35 (20–56)	36 (21–56)	33 (20–52)
Body weight (kg)	75 (45–150)	76 (49–150)	73 (45–101)
Scr (μmol/L)	81 (46–180)	83 (48–180)	78 (46–131)
Serum cystatin C (mg/L)	0.85 (0.53–1.56)	0.86 (0.53–1.56)	0.85 (0.55–1.24)
Number of patients per center			
ICR, Toulouse	13	9	4
CHU Clermont-Ferrand	1	0	1
ICO, Angers	13	9	4
Hôpital Tenon, Paris	7	5	2
Centre Léon Bérard, Lyon	14	9	5
IPC, Marseille	11	6	5
IGR, Villejuif	25	19	6
Hôpital St André, Bordeaux	3	1	2

^aTwo patients were excluded prior to data-splitting due to unavailable plasma CysC level.^bNone of the characteristics differed significantly between the two datasets (Student *t* test).^cDistribution of patients with respect to participating centers was not significantly different between the two datasets (Pearson χ^2 test).

9 patients. The mean observed carboplatin CL of these 9 patients was 180 mL/min (ranged between 153 and 223 mL/min). On average, in each cycle of treatment, the dose was decreased on day 3. For 8 patients, carboplatin was not administered on the third day because the target AUC of 24 was obtained after dose administration on days 1 and 2. In terms of the total dose over 3 days, the TDM resulted in an absolute dose change greater than 20% (i.e., lower than –20% or greater than 20%) for 20 of 89 patients at cycle 1 (dose change ranging from –33% to +44%) compared with the total dose calculated using solely the predicted CL (i.e., if TDM had not been performed). In cycles 2 and 3, 23 of 80 and 22 of 72 patients had an absolute change of total dose greater than 20%, respectively (total dose change ranging from –42% to +31%, and ranging from –40% to +24%, respectively).

The target total carboplatin AUC was reduced to 18 mg·min/mL for 9 patients of 80 in cycle 2 and 23 patients of 72 in cycle 3 due to toxicity observed during the intercycle period.

Overall carboplatin exposure (AUC) per cycle

The structural (i.e., two-compartment model) and statistical (proportional error for both interindividual and residual variabilities) population PK model described data very accurately with residual variability ranging from 18.6% to 19.0% depending on the run. The models were also associated with low η_{CL} -shrinkage (between 5% and 6%) and low ϵ -shrinkage (between 16% and 17%). Supplementary Fig. S2 shows that the individual weighted residuals versus PRED of the run on C1D1 data (as a representative example) were very close to 0, making the carboplatin CL obtained and corresponding AUC likely to accurately estimate the actual values.

Mean AUCs with ranges were 24.3 (18.8–29.4), 24.6 (21.1–30.4), and 24.2 mg·min/mL (21.5–29.4) for cycles 1, 2, and 3, respectively, at the target total AUC level of 24 mg·min/mL, and

18.0 (16.1–21.4) and 17.8 (16.0–19.8) for cycles 2 and 3 when target AUC was 18 mg·min/mL (Fig. 1).

For the AUC 24 level, the 10th and 90th percentiles of the observed AUC were (22.5; 26.8), (22.3; 26.7), and (21.9; 26.5) at cycles 1, 2, and 3, respectively, indicating that the vast majority of patients had a carboplatin exposure close to target value thank to the TDM-based individual dosing.

To further evaluate the TDM in patients with decreased renal function, Fig. 1 was reproduced by considering only the patients with Scr > 120 μmol/L at C1D1 (Supplementary Fig. S3) and shows the benefit of TDM in these particular patients compared with formulas that tend to underestimate their carboplatin CL.

Among the 17 patients that did not undergo the 3 planned cycles, 6 had unacceptable toxicity and 1 patient died because of treatment. These 7 patients received a mean AUC (min–max) of 23.4 mg·min/mL (22.3–24.8) per cycle which excludes carboplatin overexposure as the reason for their severe toxicity.

Inpatient variability

The analysis of the whole dataset with IOV allowed us to estimate intraindividual variability of carboplatin CL: the intercycle variability was 8.6%, and the interday variabilities were 8.5%, 6.3%, and 8.7% at cycles 1, 2, and 3, respectively (Supplementary Table S1). These values confirm that the inpatient variability of carboplatin CL was sufficiently limited to justify the use of a TDM strategy. Because the IOV does not allow defining a trend of variation, Table 3 presents the mean values (\pm 95% CI) of individual carboplatin clearances observed at each occasion. Both day- and cycle effects were statistically significant in the statistical analysis. For the cycle effect, there was a trend toward a decrease of carboplatin CL from cycle 1 to cycle 3 whichever the day with mean variations (with range) of –11% (–36% to +19%), –9% (–43% to +33%), and –8% (–47% to +21%) for days 1, 2, and 3, respectively. In contrast, for the intracycle variability (day effect), there was no systematic trend.

Table 2. Mean (range) daily and total doses per cycle (in milligram)

	Cycle 1 (n = 89)	Cycle 2 (n = 80)	Cycle 3 (n = 72)
Day 1	1,211 (531–1,600)	1,107 (590–1,860)	957 (530–1,500)
Day 2	1,216 (600–1,630)	1,100 (330–1,860)	975 (500–2,200)
Day 3	1,013 (0–2,650)	871 (0–1,710)	852 (0–1,580)
Total dose	3,454 (1,690–5,590)	3,078 (1,450–4,557)	2,784 (1,500–4,010)

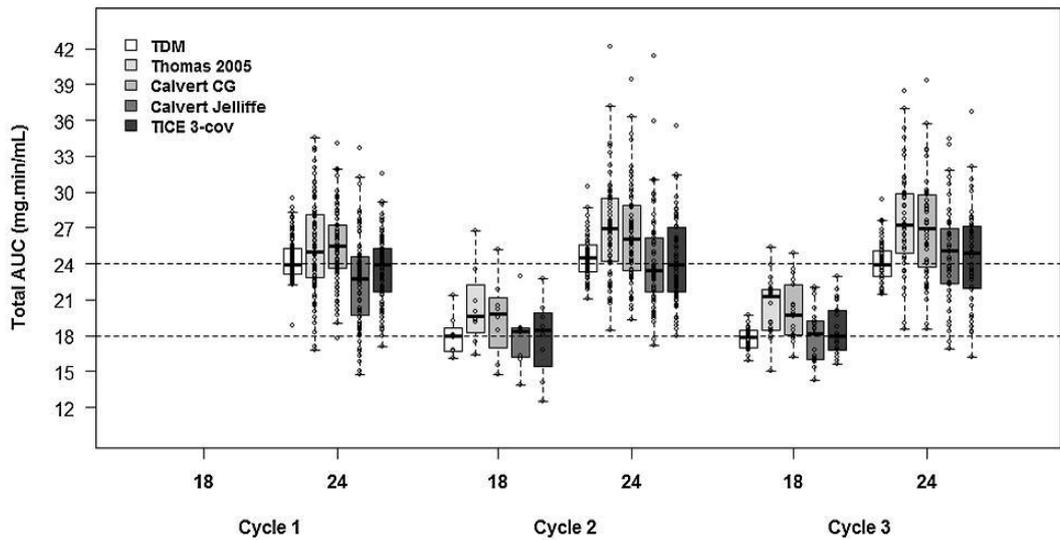


Figure 1.

Box plot of total observed or predicted carboplatin AUC per cycle with respect to the target AUC of 24 mg.min/mL and 18 mg.min/mL for each cycle of treatment. The target AUC of 18 mg.min/mL was adopted in cycle 2 and/or cycle 3 when serious ototoxicity had been observed during the intercycle period. In white is the box plot representing the distribution of total AUC of the present study where carboplatin TDM was performed; in ivory, the distribution of AUC that would have been observed in the absence of TDM (total dose calculated using formula specified in the protocol) and in light gray, medium gray, and black, if the total dose had been calculated using the Calvert-CG (Cockcroft-Gault), Calvert-Jelliffe, or the TICE 3-cov formulas, respectively.

Covariate analysis

A NONMEM analysis of CID1 concentration data of the model-building dataset (58 patients) was performed. The four covariates (SCr, CysC, BW, and age) were all significant to predict carboplatin CL. The deletion of each covariate from the full model was associated with a significant increase ($P < 0.05$) of the OFV as shown in Supplementary Table S2. The highest increase corresponded to BW followed by Scr, CysC, and age. The full equation ($\pm 95\%$ CI) named the TICE 4-cov equation was:

$$CL \text{ (mL/min)} = 128.2 \pm 6.0 \times (\text{SCr}/83)^{-0.578 \pm 0.419} \times (\text{CysC}/0.9)^{-0.368 \pm 0.357} \times (\text{BW}/76)^{+0.852 \pm 0.218} \times (\text{Age}/36)^{-0.195 \pm 0.178}$$

To further assess the benefit of CysC in the prediction of carboplatin CL in this specific population, the equation without this covariate named the TICE 3-cov was considered for prospective evaluation together with the 4-cov equation.

$$CL \text{ (mL/min)} = 130.7 \pm 6.8 \times (\text{SCr}/83)^{-0.826 \pm 0.183} \times (\text{BW}/76)^{+0.907 \pm 0.265} \times (\text{Age}/36)^{-0.223 \pm 0.179}$$

The TICE 4-cov equation and the TICE 3-cov equation were prospectively evaluated for each cycle of treatment using the D1 data of the model-validation dataset. The precision was calculated and compared with previously published equations as stated in Table 4. The MPE values corresponding to the two new

equations as well as the ones for Calvert-Jelliffe were not significantly different from 0 (no significant bias), whereas those of Calvert-CG or modified Thomas formula were ($P < 0.005$). In terms of MAPE, the best results corresponded to the two new equations (TICE 3-cov and TICE 4-cov) or Jelliffe with lower values ranging between 7.3% and 11.1% depending on the cycle and the equation. The similar performance of the two new equations indicates that CysC does not improve the predictive performance of carboplatin CL. The TICE 3-cov equation was therefore considered as the final covariate equation.

By considering the whole dataset at C1 for the target AUC of 24 (Fig. 1), the TICE 3-cov equation appeared more performant than Calvert-Jelliffe equation with 2 versus 8 of 79 patients with AUC below 18 mg.min/mL, respectively, but further prospective evaluation is needed because a part of the data was used to raise the TICE 3-cov equation.

The coefficients of determination (r^2) of regression were 0.62, 0.63, and 0.52 for the Calvert formula, TICE 3-cov formula, and the equation used for calculation of dose at CID1 (Thomas formula), respectively.

To better compare the performance of the TICE 3-cov equation and the TDM in a prospective population, Fig. 2 shows the discrepancy (presented as relative percentage error) between total dose obtained with each approach and the ideal dose in the

Table 3. Mean ($\pm 95\%$ CI) actual carboplatin clearance (mL/min) on each day of the treatment

	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Intercycle effect ^a
Day 1	142.8 \pm 7.0	129.6 \pm 6.1	124.8 \pm 5.6	$P < 0.0001$
Day 2	146.2 \pm 6.8	134.3 \pm 6.3	131.0 \pm 6.5	$P < 0.0001$
Day 3	139.8 \pm 7.4	126.0 \pm 6.1	126.1 \pm 6.4	$P < 0.0001$
Intracycle effect ^a	$P = 0.002$	$P = 0.0168$	$P = 0.0168$	

^aEvaluated using a mixed-effects model for repeated measures.

Moeung et al.

Table 4. Evaluation of different equations of carboplatin clearance prediction in the prospective validation dataset (*n* = 29 patients)

Equations	Treatment cycle	MPE (%)	MAPE (%)	Minimum PE (%)	Maximum PE (%)	<i>N</i>
Calvert-CG ^a (Cockcroft-Gault)	1	9.3 ^b	10.5	-7.5	37.2	29
	2	11.6 ^b	17	-19.6	46.3	26
	3	10.4 ^b	12.7	-14.6	44.8	25
Calvert-Jelliffe ^c	1	0.1	9.5	-20.1	30.2	29
	2	2.0	11.1	-26.7	42.5	26
	3	1.5	10	-16.8	23.4	25
Modified Thomas ^d	1	19.4 ^b	20.2	-5.4	52.5	29
	2	23.6 ^b	23.9	-3.1	77.4	26
	3	19.6 ^b	19.9	-2.7	62.3	25
TICE 3-cov ^e	1	0.5	7.3	-16.6	28.1	29
	2	2.4	14.6	-31.9	33.1	26
	3	1.4	10.2	-26.2	33.7	25
TICE 4-cov ^f	1	-0.7	8.3	-20.6	30.8	29
	2	2.5	13.8	-31.3	34.2	26
	3	-1.2	9.7	-26.4	26.1	25

Abbreviations: **Age** (years); **BSA**, body surface area (m²); **BW**, body weight (kg); **CysC**, serum cystatin C (mg/L); **MAPE**, mean absolute percentage error; **MPE**, mean percentage error; **PE**, (predicted CL - actual CL) • 100/actual CL; **SCR**, serum creatinine (μmol/L); **SEX**, 0 if male.

^aCL (mL/min) = (1.23 • BW • (140 - Age) • (1 - 0.15 • SEX) / SCR) + 25.

^b*P* < 0.05; MPE differs significantly from 0.

^cCL (mL/min) = [(98 - 0.8 • (Age - 20)) • (BSA/1.73) / (SCR • 0.0113)] + 25.

^dCL (mL/min) = 117.8 • (SCR/75)^{-0.450} • (CysC/1.0)^{-0.385} • (BW/65)^{-0.504} • (Age/56)^{-0.366} • (0.847)^{SEX}.

^eCL (mL/min) = 130.7 • (SCR/83)^{-0.826} • (BW/76)^{+0.907} • (Age/36)^{-0.223}.

^fCL (mL/min) = 128.2 • (SCR/83)^{-0.578} • (CysC/0.9)^{-0.368} • (BW/76)^{+0.852} • (Age/36)^{-0.195}.

patients of the validation cohort. The ideal dose is defined as the total dose yielding the target AUC given that the daily CLs were known. Therefore, 2 patients at cycle 1 and 4 patients at cycles 2 and 3 could not be included in this analysis because one daily CL could not be calculated (PK samples for D3 missing for example).

When the dose was calculated using CL predicted by the TICE 3-cov equation, the absolute percentage error was less than 10% in 22 patients of 27 in cycle 1, 11 of 25 in cycle 2, and 17 of 25 in cycle 3. With TDM, there were 25 patients of 27, 22 of 25, and 20 of 25 in cycles 1, 2, and 3, respectively.

Discussion

The concept of dose and plasma exposure of platinum compounds is important for the treatment of germ cell tumors. In case of recurrence or relapse after cisplatin, etoposide, and bleomycin, HD chemotherapy including HD carboplatin (TI-CE) represents one way to achieve durable remissions in approximately one-half of patients because dose escalation of cisplatin is not possible due to irreversible ototoxicity and nephrotoxicity. As for standard carboplatin treatment of other tumor sites, the concept of AUC-based dosing of carboplatin became evident. In the TI-CE HD regimen, the value of 24 mg•min/mL was chosen as target AUC (4) based on toxicity (i.e., 50% of DLT at 28 mg•min/mL) observed in a phase I study (1). However, despite the use of Calvert or Jelliffe formulas to calculate the carboplatin dose, a poor control of AUC was observed in previous studies (1, 4). The PK results of the present phase II study corroborate our previous findings (7), showing that individual dosing of carboplatin based on TDM is feasible and allows for the reaching of the target AUC with good adequacy.

We observed a correlation between predicted carboplatin CL and actual CL with coefficients of determination (*r*²) of 0.62 and 0.52 for Calvert using Cockcroft-Gault and the equation we used for dose calculation at C1D1 respectively, but actual CL

was poorly correlated to BSA (*r*² = 0.13, data not shown). However, dosing based on both equations would have been associated with carboplatin overdosing, and above all, with a large interindividual carboplatin plasma exposure (Fig. 1). On the contrary, the TDM really allowed us to control individual AUC. The result is in link with the small intraindividual variability of carboplatin CL within each cycle. Although a statistically significant variation of CL was observed within cycle, the mean change was modest and not clinically relevant with a mean IOV < 9%. Patients with extreme values of AUC are the ones with highest intracycle decrease of carboplatin CL (for example, 30 mg•min/mL in a patient with a 38% decrease of CL at cycle 2). Moreover, as illustrated in Fig. 1, the TDM is the method associated with the lower number of underexposed patients, which is also a very important point for this curative treatment.

In contrast, despite the limited value of intercycle IOV, the decrease of carboplatin CL from cycle 1 to cycle 3 was both statistically and clinically significant. As a consequence of this intrapatient variability from one cycle to the following one, the dose at day 3 was decreased in cycles 2 and 3 for several patients, although the dose given at days 1 and 2 was already calculated according to the individual carboplatin CL observed during the previous cycle. This result emphasizes the need for TDM not only in cycle 1 but also in the two following cycles for controlling individual carboplatin exposure. In addition, the extent of the dose change was not negligible because 20% to 30% of patients needed a total dose modification greater than 20%, reaching more than 40% for some patients.

The study also proved the feasibility of TDM for HD chemotherapy at a multicenter level. Several intersite configurations have been successfully implemented during this clinical trial. For three centers, the laboratory was located within the hospital in which patients were treated. For two other sites, carboplatin assay was performed within laboratories in close proximity to the clinical investigation Unit (same city but different hospitals). For the three

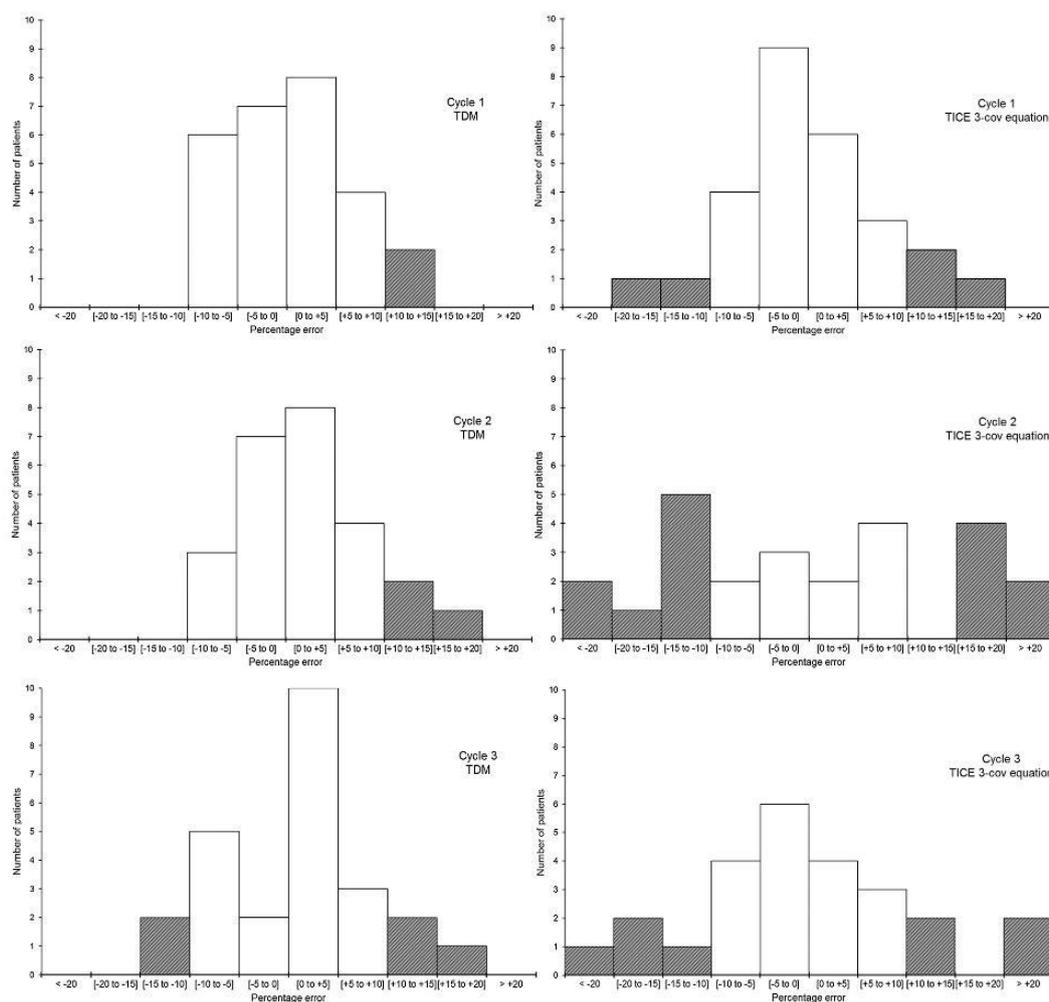


Figure 2. Number of patients versus percentage errors between the total dose per cycle administered using TDM (left) or calculated based on the final covariate model (right) and the ideal dose for cycle 1 (top), cycle 2 (middle), and cycle 3 (bottom) of treatment in the validation cohort. The ideal dose is the total dose per cycle which would give an overall AUC of 24 mg.min/mL. Hatched bars are patients with absolute percentage error larger than 10%.

remaining centers, samples were sent to the Toulouse Pharmacology laboratory and analyzed during day 2 or early day 3 for the adapted dose to be communicated to clinicians for day 3. Although it is feasible, we recognize that the procedure may be difficult to organize in all institutions. For this reason, we prospectively for a way to predict carboplatin CL accurately in order to avoid TDM.

The covariate analysis allowed us to obtain an equation (TICE 4-cov) consistent with our previous results in terms of significant covariates (BW, age, SCr, CysC). However, the coefficient relative to each of the covariate was relatively different to those of the equation we developed and prospectively validated from 357 patients who received carboplatin as part of standard (not HD) chemotherapy (9). Surprisingly, the benefit of combining SCr and CysC was lower in the present study than in the previous work as

illustrated by (i) the poor precision of the power coefficient values when the two covariates were associated (Table 4) and (ii) the result of the prospective evaluation showing similar performance of the TICE 4-cov and the TICE 3-cov equation based on BW, age, and SCr. These differences could be explained by the demographical (younger males) and functional (relatively good normal renal function) characteristics of the 89 patients in comparison with the previous population of patients.

Moreover, the age difference between the patients of our study and those of the previous PK studies from which CLp equations were obtained (8, 9, 13, 14) explains the overestimation of CLp when those formulas were used in these young patients of the present study. On the contrary, in the 89 patients of our trial, we observed a trend for CLp underestimation with the Calvert-Jelliffe equation (median value of 22.7 mg.min/mL) at cycle 1 with

Moeung et al.

10.1% of patients who would have had an AUC below 18 for a target at 24, as it was previously observed in these young patients (4, 15). The TICE 3-cov equation we developed seems to be better in terms of bias but needs further prospective evaluation. Therefore, in situations where it is impossible to perform TDM for this HD chemotherapy, the TICE 3-cov or Calvert–Jelliffe equations should be used to individualize the carboplatin dose for day 1 of cycle 1 but with the knowledge that AUC will not be controlled as accurately as with TDM. Moreover, the use of a maximum predicted carboplatin clearance in these young male patients may lead to underexposure and should be re-evaluated. For instance, in our cohort, 30 of 89 patients had a carboplatin clearance calculated with Calvert–Jelliffe higher than 150 mL/min (maximum allowed value in the ongoing TIGER trial NCT02375204). In these 30 patients, the observed carboplatin CL ranged between 117.7 and 222.6 mL/min emphasizing the benefit of TDM to avoid any under- or overdosing of these patients.

It was neither an objective nor *a priori* a way to evaluate the pertinence of the value 24 mg·min/mL previously proposed by Kondagunta and colleagues (4) as target AUC for HD carboplatin. However, evaluation of the adverse events observed during this clinical phase II study (16) confirmed that the choice of this value is adequate. Ototoxicity has been observed (ongoing analysis) and has, in some cases, led to a decrease of the target AUC to 18 mg·min/mL for cycle 2 or 3. Like ototoxicity, nephrotoxicity is not a usual side effect of carboplatin for standard regimen but has been observed after HD carboplatin treatment. The PK results themselves provided valuable information regarding renal toxicity because carboplatin CL is closely dependent of GFR. A mean decrease of carboplatin CL of 11% from cycle 1 to last cycle was observed for patients who received 3 cycles. The median decrease value (–12%) reveals two main situations: half of the patients without clinically change of carboplatin CL and half of the patients with substantial decrease of GFR. Without evidence of other intercurrent cause, we made the hypothesis that this trend of decrease of carboplatin CL was due to subacute nephrotoxicity. Overall, these results allow to anticipate nonacceptable nephrotoxicity if higher AUC had been chosen.

The benefit of TDM in terms of safety gain is difficult to assess by direct confrontation with previous single-institution TI-CE studies in which different levels of target AUCs were used (1, 4, 6). The percentage of patients who started the intensification part of the protocol and who actually received the three HD cycles (81%) is

satisfactory for a multicenter study in a very poor-risk population (16). Retrospective analysis of the measured carboplatin AUC showed that none of the patients with severe toxicity was overexposed to carboplatin.

In conclusion, this study promotes the use of carboplatin TDM for the TI-CE regimen as the only way to really control the individual exposure. This practice could be generalized to other HD carboplatin regimen when carboplatin is given on 3 or 5 consecutive days allowing dose adaptation on the last days of the cycle.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: C. Chevreau, C. Massart, A. Fléchon, E. Chatelut, F. Thomas

Development of methodology: C. Chevreau, C. Massart, E. Chatelut, F. Thomas

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): C. Chevreau, S. Broutin, J. Guitton, B. Lelièvre, J. Ciccolini, C. Massart, A. Fléchon, R. Delva, G. Gravis, J.-P. Lotz, J.-O. Bay, M. Gross-Goupil, A. Paci, S. Marsili, L. Malard, E. Chatelut, F. Thomas

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): S. Moeung, C. Chevreau, C. Massart, L. Malard, E. Chatelut, F. Thomas

Writing, review, and/or revision of the manuscript: S. Moeung, C. Chevreau, S. Broutin, B. Lelièvre, C. Massart, A. Fléchon, R. Delva, G. Gravis, J.-P. Lotz, J.-O. Bay, M. Gross-Goupil, A. Paci, E. Chatelut, F. Thomas

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Massart, A. Fléchon, M. Gross-Goupil

Study supervision: C. Chevreau, M. Gross-Goupil, E. Chatelut

Other (medical oncologist, patients' recruitment, and treatment): J.-P. Lotz

Acknowledgments

We thank the members of the French GPCO and GETUG Unicancer groups for their active contribution to the conduct of this multicenter TI-CE clinical study.

Grant Support

The study was funded by a French Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received May 12, 2017; revised July 13, 2017; accepted September 14, 2017; published OnlineFirst September 19, 2017.

References

- Motzer RJ, Mazumdar M, Sheinfeld J, Bajorin DF, Macapinlac HA, Bains M, et al. Sequential dose-intensive paclitaxel, ifosfamide, carboplatin, and etoposide salvage therapy for germ cell tumor patients. *J Clin Oncol* 2000;18:1173–80.
- Einhorn LH, Williams SD, Chamness A, Brames MJ, Perkins SM, Abonour R. High-dose chemotherapy and stem-cell rescue for metastatic germ-cell tumors. *N Engl J Med* 2007;357:340–8.
- Motzer RJ, Mazumdar M, Bajorin DF, Bosl GJ, Lyn P, Vlamis V. High-dose carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous bone marrow transplantation in first-line therapy for patients with poor-risk germ cell tumors. *J Clin Oncol* 1997;15:2546–52.
- Kondagunta CV, Bacik J, Sheinfeld J, Bajorin D, Bains M, Reich L, et al. Paclitaxel plus ifosfamide followed by high-dose carboplatin plus etoposide in previously treated germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:85–90.
- Dubs A, Jacky E, Stahel R, Taverna C, Honegger H. Ototoxicity in patients with dose-intensive therapy for cisplatin-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:1158; author reply 1158–1159.
- Feldman DR, Sheinfeld J, Bajorin DF, Fischer P, Turkula S, Ishill N, et al. TI-CE high-dose chemotherapy for patients with previously treated germ cell tumors: results and prognostic factor analysis. *J Clin Oncol* 2010;28:1706–13.
- Chevreau C, Thomas F, Couteau C, Dalenc F, Mourey L, Chatelut E. Ototoxicity of high-dose carboplatin. *J Clin Oncol* 2005;23:3649–50.
- Thomas F, Séronie-Vivien S, Gladieff L, Dalenc F, Durrand V, Malard L, et al. Cystatin C as a new covariate to predict renal elimination of drugs: application to carboplatin. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:1305–16.
- Schmitt A, Gladieff L, Lansiaux A, Bobin-Dubigeon C, Etienne-Grimaldi M-C, Boisdron-Celle M, et al. A universal formula based on cystatin C to perform individual dosing of carboplatin in normal weight, underweight, and obese patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:3633–9.
- Chatelut E, Pivrot X, Otto J, Chevreau C, Thyss A, Renée N, et al. A limited sampling strategy for determining carboplatin AUC and monitoring drug dosage. *Eur J Cancer* 2000;36:264–9.

11. LeRoy AF, Wehling ML, Sponseller HL, Friauf WS, Solomon RE, Dedrick RL, et al. Analysis of platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Biochem Med* 1977;18: 184-91.
12. Léger F, Séronie-Vivien S, Makdassi J, Lochon I, Delord JP, Sarda C, et al. Impact of the biochemical assay for serum creatinine measurement on the individual carboplatin dosing: a prospective study. *Eur J Cancer* 2002;38:52-6.
13. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, O'Reilly S, Burnell M, Boxall FE, et al. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol* 1989;7:1748-56.
14. Chatelut E, Canal P, Brunner V, Chevreau C, Pujol A, Boneu A, et al. Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:573-80.
15. Quinton A, Lewis P, Ali P, Morgan C, Bertelli G. A comparison of measured and estimated glomerular filtration rate for carboplatin dose calculation in stage I testicular seminoma. *Med Oncol* 2013;30:661.
16. Chevreau C, Massard C, Flechon A, Delva R, Gravis G, Lotz J-P, et al. Phase II trial of TI-CE high dose chemotherapy (HDCT) with drug monitoring for individual carboplatin dosing in patients with relapsed advanced germ cell tumors: a multicentric prospective GETUG trial. *J Clin Oncol* 2017;35: abstract 401.

Supplementary data S1. Description of the population pharmacokinetic model used to evaluate the inter-occasion (inter-day and inter-cycle) variability.

```

$PROBLEM IOV model
$INPUT ID DATE TIME DV MDV AMT RATE EVID BSA
$DATA IOVwhole.prn
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4
$PK
OCC1=0
OCC2=0
OCC3=0
OCC4=0
OCC5=0
OCC6=0
OCC7=0
OCC8=0
OCC9=0

IF(DATE.EQ.1) OCC1=1
IF(DATE.EQ.2) OCC2=1
IF(DATE.EQ.3) OCC3=1
IF(DATE.EQ.22) OCC4=1
IF(DATE.EQ.23) OCC5=1
IF(DATE.EQ.24) OCC6=1
IF(DATE.EQ.43) OCC7=1
IF(DATE.EQ.44) OCC8=1
IF(DATE.EQ.45) OCC9=1

TVCL=THETA(1)
A=ETA(1)
B=ETA(2)*OCC1+ETA(3)*OCC2+ETA(4)*OCC3
C=ETA(5)*OCC4+ETA(6)*OCC5+ETA(7)*OCC6
D=ETA(8)*OCC7+ETA(9)*OCC8+ETA(10)*OCC9
E=ETA(11)*(OCC1+OCC2+OCC3)+ETA(12)*(OCC4+OCC5+OCC6)+ETA(13)*(OCC7+OCC8+OC
C9)

CL=TVCL*EXP(A+B+C+D+E)

TVV1=THETA(2)*BSA
TVQ=THETA(3)
TVV2=THETA(4)*BSA
V1=TVV1*EXP(ETA(14))
Q=TVQ*EXP(ETA(15))
V2=TVV2*EXP(ETA(16))

S1=V1
AUC=AMT/CL

$THETA (1,7,18) ; CL
$THETA (1,3,4,20) ; V1
$THETA (0.1,9.4,30) ; Q
$THETA (0.1,4,) ; V2

$OMEGA 0.1 ;iiv CL
$OMEGA BLOCK(1) 0.01 ;IOVCL C1
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) 0.1 ;IOVCL C2
$OMEGA BLOCK(1) SAME

```

```

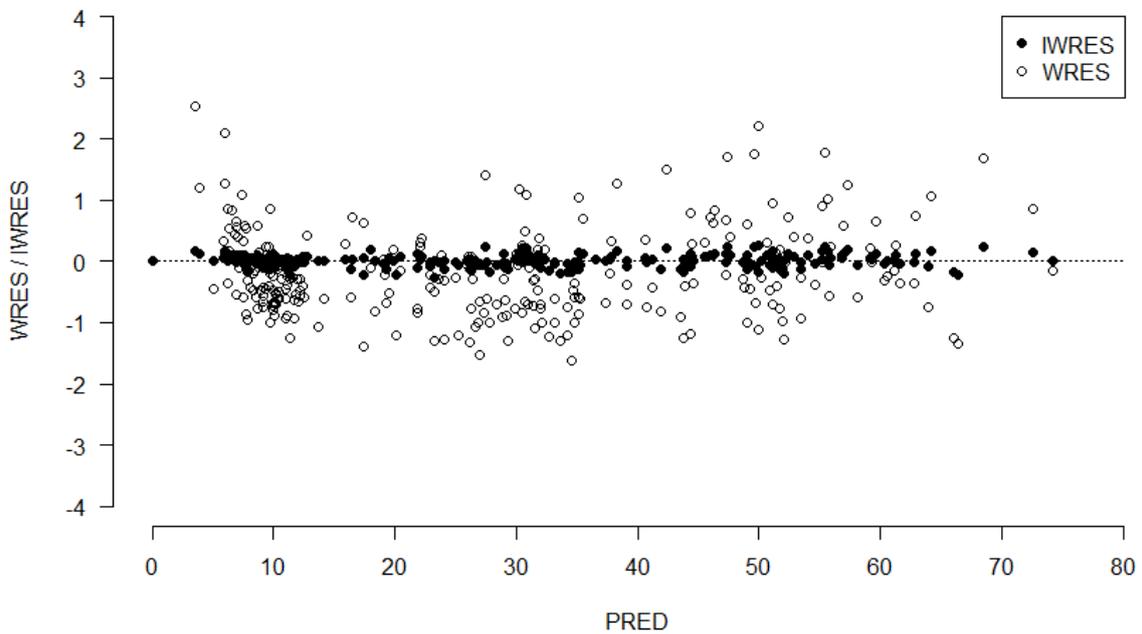
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) 0.1 ;IOVCL C3
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) 0.1 ;IOVCL intercycle
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA 0.01 ;iiv V1
$OMEGA 0 FIXED ;iiv Q
$OMEGA 0.05 ;iiv V2

$ERROR
DEL=0
IF (F.EQ.0) DEL=1
W=F+DEL
Y=F+W*EPS(1)
IPRED=F
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

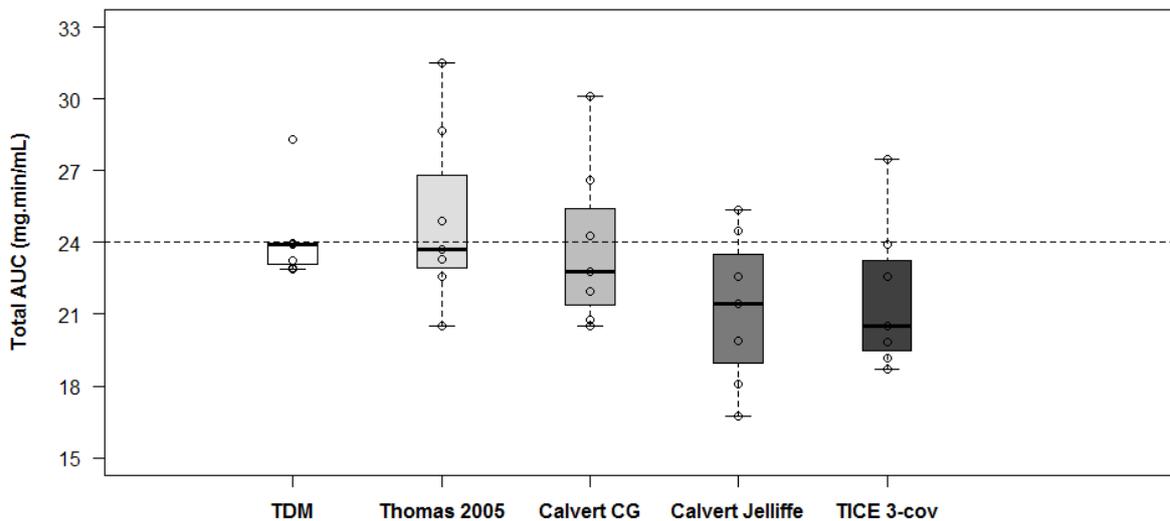
$SIGMA .1

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION SIGDIGITS=3 NOABORT
$COVARIANCE PRINT=E
$TABLE ID DATE TIME CL AUC TVCL DV V1 V2 IPRED PRED
MDV EVID ONEHEADER NOPRINT FILE=IOVwholedataPARAM.PAR
$TABLE ID TIME IPRED IWRES NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab1
$TABLE ID CL V1 Q V2 ETA(1) ETA(2) ETA(3) ETA(4) ETA(5)
ETA(6) ETA(7) NOPRINT ONEHEADER FILE=pattab1

```



Supplementary Figure S2. Weighted residuals (WRES) and individual weighted residuals (IWRES) versus population predicted concentrations (PRED) plots obtained from NONMEM analysis on C1D1 data of the 89 patients of the PK study.



Supplementary Figure S3. Box plot of total observed carboplatin AUC (when TDM is used) or total predicted AUC (when dose is calculated using solely formula-based method) in cycle 1 of patients having serum creatinine level greater than 120 μM (n=7).

Supplementary Table S4. Parameter estimates obtained from the population pharmacokinetic model evaluating inter-occasion (inter-day and inter-cycle) variability.

Parameter	Description	Estimate	RSE (%)	Shrinkage (%)
CL (L/H)	Clearance of elimination	8.5	2.6	-
V1 (L)	Volume of the central compartment	7.4	4.1	-
Q (L/H)	Inter-compartmental clearance	8.2	21.7	-
V2 (L)	Volume of the peripheral compartment	3.8	5.1	-
IIV CL ^a		21.4	9.8	4.9
IIV V1 ^a		18.9	13.0	6.8
IIV Q ^a		-*	-	-
IIV V2 ^a		18.1	17.5	31.3
IOV CL inter-cycle ^b		8.6	14.6	39.3
IOV CL inter-day cycle 1 ^b		8.5	16.0	34.6
IOV CL inter-day cycle 2 ^b		6.3	16.5	48.4
IOV CL inter-day cycle 3 ^b		8.7	39.4	52.3
ε (%)	Residual error	12.7	12.5	15.4

RSE: Relative standard error; IIV: Inter-individual variability; IOV: Inter-occasion variability

^a Inter-individual variability expressed as coefficient of variation and in % of the parameter estimate

^b Inter-occasion variability expressed as coefficient of variation and in % of the parameter estimate

* Inter-individual variability of Q fixed at 0

Supplementary Table S5. Full and reduced covariate equations obtained from the model-building dataset (n = 58 patients)

Equation for CL (mL/min)	θ ₁	θ ₂	θ ₃	θ ₄	θ ₅	ΔOFV ^b	p-Value	IIV (%) ^c
Full covariate model^a								
θ ₁ • (SCr/83) ^{θ₂} • (CysC/0.9) ^{θ₃} • (BW/76) ^{θ₄} • (Age/36) ^{θ₅}	128.2	-0.578	-0.368	0.852	-0.195			15.7
	(±6.0)	(±0.419)	(±0.357)	(±0.218)	(±0.178)			
Reduced covariate models								
θ ₁	135.8					+72.7	<0.001	30.4
θ ₁ • (CysC/0.9) ^{θ₃} • (BW/76) ^{θ₄} • (Age/36) ^{θ₅}	126.7		-0.789	0.661	-0.228	+20.0	<0.001	18.8
θ ₁ • (SCr/83) ^{θ₂} • (BW/76) ^{θ₄} • (Age/36) ^{θ₅}	130.6	-0.826		0.907	-0.223	+ 8.3	<0.005	17.0
θ ₁ • (SCr/83) ^{θ₂} • (CysC/0.9) ^{θ₃} • (Age/36) ^{θ₅}	127.2	-0.344	-0.487		-0.116	+32.6	<0.001	21.3
θ ₁ • (SCr/83) ^{θ₂} • (CysC/0.9) ^{θ₃} • (BW/76) ^{θ₄}	129.0	-0.601	-0.399	0.813		+ 4.9	<0.05	16.4

^a Values are expressed as mean (±95% CI).

^b Change in OFV compared with the final covariate model.

^c IIV: interindividual variability not explained by covariates (if any).

CL = clearance; BW = body weight (Kg); SCr = serum creatinine (μM); CysC = serum cystatin C (mg/L); Age (years); OFV = objective function value;

I.B. Estimation de la clairance ultrafiltrable à partir des concentrations plasmatiques totales

I.B.1. Article n°2

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans le journal « Therapeutic Drug Monitoring »
le 6 Septembre 2018.

Estimation of Unbound Carboplatin Clearance from Total Plasma Concentrations as a Means of Facilitating Therapeutic Drug Monitoring

Sotheara MOEUNG^{1,2}, Christine CHEVREAU¹, Vianney POINSIGNON³, Jérôme GUITTON⁴, Bénédicte LELIEVRE⁵, Joseph CICCOLINI⁶, Laurence GLADIEFF¹, Christophe MASSART⁷, Aude FLECHON⁸, Rémy DELVA⁹, Gwenaëlle GRAVIS¹⁰, Jean-Pierre LOTZ¹¹, Jacques-Olivier BAY¹², Marine GROSS-GOUPIL¹³, Julia DELAHOUSSE³, Thomas FILLERON¹, Isabelle LOCHON^{1,2}, Etienne CHATELUT^{1,2}, Fabienne THOMAS^{1,2}

- 1) Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France
- 2) CRCT, Université de Toulouse, Inserm, Toulouse, France
- 3) Institut Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Service de pharmacologie Villejuif, France
- 4) Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Lyon, France
- 5) Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Angers, France
- 6) CHU La Timone, Marseille, France
- 7) Institut Gustave Roussy, Oncologie Médicale, Villejuif, France
- 8) Centre Léon Bérard, Lyon, France
- 9) Institut De Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Angers, France
- 10) Institut Paoli Calmettes, Marseille, France
- 11) Hôpital Tenon, Paris, France
- 12) CHU Clermont Ferrand, France
- 13) Hôpital Saint André, Bordeaux, France

The authors declare no potential conflicts of interest

Keywords: Unbound carboplatin, therapeutic drug monitoring, high-dose chemotherapy, estimation, total plasma carboplatin concentration

Running Title: carboplatin TDM from total plasma concentrations

Additional information.

The study was funded by a French Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC).

Corresponding author:

Pr Etienne Chatelut

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole

1 avenue Irène Joliot-Curie

31059 Toulouse Cedex 9

chatelut.etienne@iuct-oncopole.fr

Tél : +33 5 31 15 52 50

Fax : +33 5 31 15 55 79

Word count: 3852 words

Total number of figures: 3

Total number of tables: 4

Supplementary data: 1

Abstract

Background: Therapeutic drug monitoring of carboplatin is based on its unbound clearance (CL_U) determined by Bayesian analysis on unbound (U) concentrations. However, the ultrafiltration of plasma samples presents technical and time constraints. Therefore, the present study aims to estimate CL_U using total plasma (P) concentrations.

Methods: U and P concentration data of 407 patients were obtained from two clinical studies in which actual CL_U had been determined for each patient. The patients were then split into development (277 patients) and prospective datasets (130 patients). Two approaches were evaluated. *PK-model-only approach:* a three-compartment pharmacokinetic (PK) model based on U and P concentrations and taking into account the protein binding process was developed. The model with patient covariates was also evaluated. *Linear regression approach:* an equation ($CL_U = a \cdot CL_P + b$) was obtained by linear regression analysis between actual CL_U and CL_P which is the total plasma clearance obtained by analyzing P concentrations according to a two-compartment PK model. Predictive performance was then assessed within the prospective dataset by estimating CL_U from P concentrations using each approach and computing the relative percentage error (PE) between estimated CL_U and actual CL_U .

Results: The linear regression equation was $CL_U \text{ (L/h)} = 1.15 CL_P \text{ (L/h)} + 0.13$. The mean PE (MPE) between CL_U (estimated using the equation) and the actual CL_U was +1.2% (ranging from -31% to +33%) and the mean absolute PE (MAPE) was 9.7%. With the three-compartment PK model, the MPE was +2.3% (ranging from -41% to +31%), and the MAPE was 11.1%. Inclusion of covariates in the three-compartment model did not improve the estimation of CL_U [MPE: +6.3% (from -33% to +37%); MAPE=11.4%].

Conclusions: The linear equation gives a relatively good estimation of CL_U based on P concentrations, making PK-based carboplatin dose adaptation possible for centers without ultrafiltration facilities.

INTRODUCTION

Carboplatin represents a unique anticancer drug for which individualization of dose according to body surface area (BSA) has been replaced by area-under-the-concentration-time-curve (AUC) dosing in routine practice. The AUC used corresponds to the unbound carboplatin concentrations rather than the total plasma concentrations. Therefore, the dose is the product of a target AUC and unbound carboplatin clearance (CL_U) which is usually predicted according to various formulas¹⁻³. However, the prediction of CL_U presents some limitations^{4,5} and therapeutic drug monitoring (TDM) of carboplatin has been proven to be beneficial in several protocols, particularly, in pediatric oncology^{6,7} or high-dose (HD) chemotherapy^{8,9}. For HD regimen, the high level of AUC (e.g., 20 or 24 mg.min/mL vs. 4-6 mg.min/mL for standard chemotherapy) requires a good control of the exposure in order to avoid unacceptable toxicity or underexposure of patients, which may hamper treatment benefit. Moreover, each cycle is composed of several (usually between 3 and 5) daily infusions giving, therefore, the opportunity to adjust the dose of the last infusion(s) according to the results of TDM performed after the first administration.

We have recently demonstrated that Bayesian-based TDM can be performed in patients receiving the TI-CE (Taxol+Ifosphamide followed by Carboplatin+Etoposide) HD regimen to control inter-patient variability of exposure.¹⁰ It consists in adapting the dose within each cycle of treatment based on CL_U determined by Bayesian analysis of unbound concentrations. These unbound (or free) concentrations are measured in plasma ultrafiltrate obtained by using an ultrafiltration device. However, ultrafiltration of plasma samples has to be carried out immediately after blood sampling since platinum binds covalently to plasma proteins. Delayed centrifugation would be associated with an underestimation of the unbound platinum concentrations.¹¹ Some technical aspects require human and material resources; therefore limiting the implementation of TDM in some centers.

The objective of the present analysis is to develop and validate an approach to estimate individual CL_U from a limited number of the total plasma concentrations in order to allow implementation of Bayesian-based TDM even when the ultrafiltration procedure cannot be performed. Two different approaches were evaluated and their performance was prospectively assessed. The first approach is a “PK-model-only approach” based on a three-compartment pharmacokinetic (PK) model, developed from a simultaneous analysis of the total and unbound carboplatin plasma concentrations, to directly estimate the CL_U . The second approach is a “linear regression approach” which consists in estimating CL_U using an equation ($CL_U = a \cdot CL_P + b$) obtained by performing a linear regression analysis between actual CL_U and CL_P which is the total plasma clearance determined by Bayesian analysis of the total plasma concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Plasma carboplatin concentration data of 407 patients were obtained during two clinical trials: 321 patients receiving standard dose (SD) of carboplatin as part of a PK study evaluating a universal formula based on cystatin C to perform individual dosing of carboplatin³ and 86 patients receiving the TI-CE HD protocol as part of a multicenter phase II trial (NCT00864318) evaluating TDM of HD carboplatin¹⁰. Patients’ characteristics are shown in Table 1.

Carboplatin administration, blood sampling and assay

Data corresponding to the first carboplatin infusion were analyzed. Carboplatin was administered as a 1-hour infusion, and the daily dose was determined according to the target unbound plasma carboplatin AUC of 4 – 6 mg.min/mL in the SD study and 8 mg.min/mL in the HD study. The administered first dose ranged from 170 to 1,600 mg and from 531 to 1,600 mg in SD and HD studies respectively. Moreover, for the HD study, each cycle of treatment was composed of 3 daily doses.

In both trials, blood samples were taken at 5 minutes before the end of the infusion (S1), 1h (S2) and 4h (S3) after the end of infusion according to a limited sampling strategy

developed previously.¹² In the SD study, an additional blood sample (S4) was obtained after 3 weeks (immediately before the cycle 2 of carboplatin administration). Each blood sample was immediately centrifuged at 1500g during 10 min at 4 °C. After this first centrifugation, 1 mL of plasma was then immediately ultrafiltered (centrifugation during 15 min at 1500 g at 4 °C) using the Amicon MPS1 micropartition system (Amicon product, Millipore, Saint-Quentin-Yvelines, France) with YM-T membrane. The remaining plasma (not used for ultrafiltration) was kept frozen for the determination of the total plasma concentration. Total and unbound carboplatin plasma concentrations were determined by means of flameless atomic absorption spectrophotometric analysis according to a previously described and validated method.¹³

Determination of actual unbound carboplatin clearance

The individual actual CL_U had been obtained in each study by population pharmacokinetic (pop-PK) analysis using Nonlinear Mixed-Effects Modeling and empirical Bayes estimation on unbound carboplatin plasma concentrations. As a brief description, the concentration data were combined with a database composed of 188 patients (of which 143 patients have rich PK samples) and analyzed according to a two-compartment PK model using the NONMEM software program version 7.2 (Icon Development Solution, Ellicott City, MD). Residual and inter-patient variabilities were both described using proportional model, and first-order conditional estimation method with interaction (FOCE-I) was the estimation method used. Typical values of volume of distribution in central (V_1) and peripheral (V_2) compartments were both proportional to body surface area (BSA), and no covariates were considered for the typical value of CL_U and inter-compartmental clearance (Q). A detailed description of the analysis can be found in previous studies.^{3,10,14}

Development and validation data set, and methods for CL_U estimation

The whole population of 407 patients of the present analysis was randomly split into a development dataset of 277 patients and a validation dataset of 130 patients. The development dataset was used to develop two different methodologies for estimating CL_U : one was based on the simultaneous modeling of the total and unbound plasma carboplatin concentrations to develop a three-compartment PK model, and the other

consists in performing a linear regression between actual CL_U and CL_P (determined separately) to obtain a linear regression equation.

Simultaneous modeling of total plasma and unbound concentrations

Both total and unbound plasma carboplatin concentrations of the development dataset were fitted to a three-compartment mammillary PK model (tricom-model; Figure 1) as described by Urien and colleagues¹⁵ using the NONMEM program (version 7, level 2.0) with the first-order conditional estimation and INTERACTION (FOCE-I) option.

The PK parameters to be estimated are elimination clearance (CL_{10}), inter-compartmental clearance (Q), volume of distribution in central (V_1) and peripheral (V_2) compartments of *unbound* species; volume of distribution (V_3) and elimination rate constant of *bound* species (K_{30}) and protein-binding rate constant (K_{13}). Clearance of unbound carboplatin (CL_U) was then determined by the relation:

$CL_U = CL_{10} + CL_{13}$, where $CL_{13} = K_{13} \times V_1$ is the clearance of unbound carboplatin associated with the irreversible protein binding.

The residual variability was described by an exponential model which includes the “study” effect. The predicted total and unbound plasma concentrations were separately fitted to the measured total plasma concentration and the measured unbound plasma concentration respectively.

The distribution of the PK parameters was assumed to follow a log-normal distribution; therefore, the inter-individual variability was modeled as an exponential function. Based on our previous work, typical values of V_1 and V_2 were to be set proportional to body surface area and no covariates were considered for the other parameters (tricom-model).

However, the influence of other covariates on other parameters (CL_{10} , K_{13} , K_{30} , and V_3) was also evaluated to improve the performance of the original model in terms of estimating CL_U : age (in years), sex (1 if female and 0 if male), body weight (BW in kilograms), serum creatinine (Scr in μM) and cystatine C (CysC in mg/L) on CL_{10} , and the influence of serum albumin (ALB in g/L) and total protein (PROT in g/L) on K_{13} , K_{30} and V_3 . The covariate analysis on CL_{10} was performed on 276 patients instead of 277 due to

missing values (1 patient for CysC), and for the same reason, the analysis of the influence of PROT on K_{13} , K_{30} and V_3 was carried out on 239 patients and that of ALB, on 210 patients.

The influence of each covariate was then assessed according to an allometric equation. For example,

$$TVCL_{10} = \theta_1 \times (\text{age}/\text{mean age})^{\theta_2}$$

where θ_1 is the typical value of CL_{10} ($TVCL_{10}$) for a patient with the mean age value, and the θ_2 is the estimated influential factor for the covariate “age”.

Each covariate was considered as having a significant impact on a PK parameter if its inclusion decreases the objective function value (OFV) by at least 3.84 compared to the original model (khi-2 test of difference with $p < 0.05$, one degree of freedom). OFV is equal to minus twice the log likelihood of the data. This value is an indicator of the goodness-of-fit of the model. An intermediate model including all the significant covariates was then obtained. Finally, a stepwise backward elimination procedure was carried out. Any covariate whose elimination increases the OFV by more than 6.6 ($p < 0.01$, one degree of freedom) was retained in the final model (tricom-model with covariates).

Estimated CL_U of each patient of the prospective dataset was then obtained as empirical Bayes estimates by analyzing only their total plasma concentration data obtained during the 24-hour post-infusion (i.e., without S4 sample) combined with both the total and unbound plasma concentrations of the development dataset. The analysis was performed according to the tricom-model as well as the tricom-model with covariates, and during both runs, the models' fixed effects (θ s) were fixed at their values obtained with the development dataset.

Linear regression approach

First, CL_p of patients of the development dataset were determined based on a two-compartment PK model with first order conditional estimation-interaction (FOCE-I) method (similar to the model used to obtain actual CL_U). The analysis was performed

using NONMEM program on only the total plasma concentration data of the 277 patients of the development dataset (without the database of 188 patients) where each patient had only the 3 concentrations of the 24-hour post-infusion (i.e., without S4 sample).

Secondly, multiple linear regression analysis was performed to model the relationship between actual CL_U (dependent variable) and CL_P and (PROT or ALB) (independent variables). PROT or ALB was the only covariate considered for the multiple linear regression analysis due to the well-known irreversible binding of carboplatin to plasma protein which could affect the CL_U .

For patients of the prospective dataset, their CL_P were determined by combining their total plasma concentrations during the 24-hour post-infusion (i.e., without S4 sample) with the total plasma concentration data of the development dataset and performing the analysis based on the two-compartment PK model presented above. During the analysis, all the model's fixed effects (θ s) were fixed at the values obtained with the development dataset. Their CL_U was subsequently estimated using the linear regression equation obtained from the development dataset.

Predictive performance evaluation

The predictive performance of each approach (i.e., PK-model-only and linear regression) was then evaluated on the prospective dataset by computing the relative prediction or percentage error. For the j^{th} patient, the relative prediction error [pe_j (%)] was defined as follows:

$$pe_j (\%) = (\text{estimated } CL_U - \text{actual } CL_U) \times 100 / \text{actual } CL_U$$

The mean percentage error [$MPE = N^{-1} \cdot \sum_{j=1}^N (pe_j)$ where N is the number of patients] and the mean absolute percentage error [$MAPE = N^{-1} \cdot \sum_{j=1}^N |pe_j|$] were computed as a measure of bias and precision respectively.

The best approach was further assessed on HD patients of the prospective dataset in order to evaluate its utility for TDM of carboplatin in the TI-CE protocol. The total AUC that would have been obtained from TDM-based CL_U estimation from total plasma

carboplatin was then calculated and compared with that obtained from TDM-based actual CL_U (i.e., determined by Bayesian analysis of unbound carboplatin concentrations as previously described¹⁰) as well as with the AUC that would have been obtained if the dose was calculated using CL_U predicted by Calvert formula with GFR estimated either by Jelliffe¹⁶ or Cockcroft-Gault¹⁷ equation. Since the target total AUC (over 3 days) is 24 mg.min/mL, the adapted dose for day 3 based on TDM was calculated as follows:

$$\text{Dose}_{D3} \text{ (mg)} = [24 - (\text{Dose}_{D1} + \text{Dose}_{D2}) / \text{“D1 actual or estimated } CL_U\text{”}] \times \text{“D1 actual or estimated } CL_U\text{”}$$

Where Dose_{D1} and Dose_{D2} were dose on day 1 (D1) and day 2 (D2) respectively and were calculated as explained in our previous study¹⁰. Total AUC was then obtained by the sum of daily AUC calculated by dividing each daily carboplatin dose by the actual daily CL_U retrospectively obtained from unbound concentrations at each day¹⁰. For the Calvert formula-based approach, each daily carboplatin dose was calculated by dividing the total dose (i.e., 24 x predicted CL_U) by 3 days, and the total AUC was then obtained as explained above.

RESULTS

Final population models and linear regression obtained from the development dataset

✓ *Simultaneous modeling of plasma and unbound concentrations*

Unbound carboplatin represented 95.2%, 89.8%, and 71.6% of total carboplatin at S1, S2, and S3 respectively, with no significant difference between SD and HD studies.

The three-compartment PK model describes the data very accurately with residual variability ranging from 9 % to 16 % depending on the study and the type of concentration (unbound or total plasma). The goodness-of-fit of the data is shown in Figure 2, and the model parameter values (fixed effects and random effects) are listed in Table 2.

The influence of age, CysC, BW, Scr and sex were found to be significant on CL_{10} , but that of ALBU and PROT was not significant on K_{13} , K_{30} or V_3 . The estimated influential factor of each significant covariate is shown in Table 2.

✓ ***Linear regression approach***

Parameter estimates of the two-compartment PK model for total plasma carboplatin are given in Table 3 and its goodness-of-fit plot in Figure 3. The model was associated with a relatively low residual variability (14%).

The regression coefficient associated with PROT (0.002, $p=0.852$) or ALB (-0.02, $p=0.07$) in the multiple linear regression analysis was not significantly different from 0 meaning that neither of them is a significant predictor of CL_U , making CL_P the only independent variable retained in the model. So a simple linear regression between CL_P and actual CL_U of the development dataset was performed and the equation obtained was:

$$CL_U \text{ (L/h)} = 1.15 CL_P \text{ (L/h)} + 0.13 \text{ with a coefficient of determination (} r^2 \text{) of 0.75.}$$

Prospective evaluation of both approaches

CL_U of each patient of the prospective dataset was estimated by analyzing their plasma concentrations observed at S1, S2 and S3 sampling time using either tricom-model based approach or linear regression approach. MPE, MAPE and ranges of the relative prediction error [pej (%)] are shown in Table 4. Because each of the two studies corresponded to different regimen types (SD and HD carboplatin), predictive performance was also calculated separately for both studies. The best approach corresponds to the linear equation with the MPE value of +1.2% (ranging from -31% to +33%) and MAPE of 9.7%. The MPE and MAPE corresponding to the estimation using the tricom-model was +2.3% (ranging from -41% to +31%) and 11.1% respectively. Although covariates improved the performance of the tricom-model (decrease of OFV), they did not improve the estimation of CL_U [MPE= +6.3% (from -33% to +37%); MAPE=11.4%].

We have also evaluated the benefit of considering the late sample (i.e., S4 just before cycle 2) in the tricom-model for 66 patients of the SD study for whom it was available: the performance of CL_U estimation was not improved (data not shown).

The utility of linear regression approach for TDM was further evaluated on 30 HD patients of the prospective data instead of 34 (4 HD patients were excluded because at least one daily actual CL_U was not available) in comparison with 3 other approaches namely the TDM based on actual CL_U as well as the dose calculation based on CL_U predicted by Calvert formula where GFR was estimated using Jelliffe or Cockcroft-Gault equation. As shown in supplementary Figure 1, the TDM based on total carboplatin tends to increase the interindividual variability of carboplatin exposure and the number of underexposed patients as compared to the TDM based on unbound carboplatin. However, the extent of AUC dispersion was smaller and the median AUC was closer to the target than the use of Calvert equation for CL_U prediction.

DISCUSSION

The results of the present analysis show how to estimate CL_U from the total plasma concentrations using two different approaches. The PK-model-only approach allows a direct estimation of CL_U using a three-compartment PK model which takes into account the protein binding process. The unbound and total plasma concentration data were accurately described by this model as shown by Figure 2. The population values of the PK parameters are in accordance with those observed in the literature. For instance, the population value of CL_U (7.2 L/h) is similar to that reported by previous studies^{8,18}. Despite the complexity of the model and the sparse data of each patient, the estimation of individual CL_U was relatively good with a precision of 11%. However, on average, the model tends to slightly overestimate the CL_U as shown by the positive value of the MPE. At the individual level, on the contrary, CL_U could be underestimated by as much as 41% in some patients.

Based on the model used to determine actual CL_U in previous studies, the tricompart-model was evaluated with both typical values of V_1 and V_2 proportional to BSA. However, other covariates were also tested on other PK parameters (CL_{10} , K_{13} , K_{30} and V_3). The significant covariates are those already known to influence unbound carboplatin elimination (age, CysC, BW, Scr and sex). No relationships were found between

serum albumin or total protein and K_{13} , K_{30} or V_3 although carboplatin is known to bind irreversibly to plasma proteins. As explained in the study conducted by Urien et colleagues,¹⁵ this observation may be due to an insufficiently wide range of serum protein concentrations and to missing data in some patients. Nevertheless, the model containing significant covariates did not improve the estimation of CL_U .

Despite its simplicity with regard to the PK-model-only approach, the linear regression approach estimates the CL_U at least as accurately as the tricompart-model-only method if not slightly better with the MAPE of 9.7%. Moreover, it is also less biased with the MPE value of +1.2%. The coefficient of determination (r^2) of 0.75 indicates a close correlation between CL_U and CL_P with the value of CL_U rather consistently larger than CL_P by 15% as indicated by the regression equation. This means that unbound carboplatin is predominant in the plasma or, in other words, the bound fraction is low during the first 4 hours of the sampling period. Indeed, the protein-bound fraction has been reported to be around 30-40% *in vitro*^{19,20} and the plasma elimination profile of platinum closely parallels unbound ultrafiltrable platinum and carboplatin for the first 6 hours after administration²¹. The low bound fraction is explained by the relatively low reactivity of carboplatin with plasma protein²² which is confirmed by the small protein-binding rate constant ($K_{13} = 0.042 \text{ h}^{-1}$) obtained from the tricompart-model. Inclusion of a late sample did not improve the performance of the CL_U estimation. That may be explained by the fact that when time elapsed after the infusion increases, the percentage of difference between unbound and bound carboplatin increases (to reach 100%) making the latter less informative. Moreover, TDM of carboplatin should not be dependent of a too late sample to be applicable and easily conducted in routine practice.

With either approach, CL_U seems to be better predicted in the HD regimen than in the SD protocol as shown in Table 4. This can be explained by a relatively more homogenous patient population in the former than in the latter. In the HD study, the study population consists of young adult male patients with germ cell tumor (between 20 to 56 years of age) having relatively normal renal function (Scr ranged from 46 to 180 μM). On the contrary, patients of the SD study have various cancers,

and their ages and renal functional states are relatively more dispersed (21 to 87 years of age and Scr range of 25 to 433 μ M, respectively).

Although the mean MPE and MAPE values of the linear regression approach are encouraging, we need to keep in mind that for some patients, these values reach 30% and will consequently lead to an over- or underestimation of the dose of 30% in the same extent. Moreover, the error associated with the estimation of CL_U from CL_P will be added to the analytical variability of the carboplatin assay which can reach 20%. If both variabilities cumulate in the same direction for a given patient, the estimated recommended dose might be excessively over or under-estimated. For instance, in the HD protocol where the total AUC (over 3 days) should reach 24 mg.min/mL, a higher number of patients would have been underexposed compared to the use of CL_U obtained from unbound concentrations to calculate the adapted dose for Day 3 (Supplementary Figure 1). On the other hand, the highest AUC reached is 27.4 mg.min/mL, which is similar to the highest value obtained with unbound concentration data and corresponds to an acceptable AUC for this HD regimen. The performance of this estimation remains better than the use of Calvert formula to predict CL_U which is associated with higher bias and larger variability. Nevertheless, whenever possible, we recommend the CL_U determination from unbound concentrations as it remains the most accurate practice.

The present work aims to give clinicians and pharmacologists alike an appreciation of the feasibility and the performance of the alternative method to obtain CL_U from plasma samples by bypassing the ultrafiltration process. This method represents a similar complexity in term of PK analysis with regards to the method based on unbound concentrations (i.e., it required nonlinear mixed effects model analysis) but it includes an additional step to convert CL_P into CL_U using the linear regression equation. However, it makes the practical parts (sample handling and preparation in clinical department or laboratory) easier.

The method suggested to estimate CL_U from total plasma carboplatin concentrations could also be useful when insufficient ultrafiltrate volume is collected, which can sometimes occur and constrains several investigators to exclude data of patients²³. Moreover, for any studies in which only total plasma concentrations were determined

(such as that performed by Sato and colleagues)²⁴, it would allow to obtain corresponding ultrafiltrate parameters. Finally, it might be useful to evaluate this approach (CL_U estimation based on CL_P using available datasets) in pediatric populations for whom carboplatin TDM is of particular interest⁶.

CONCLUSION

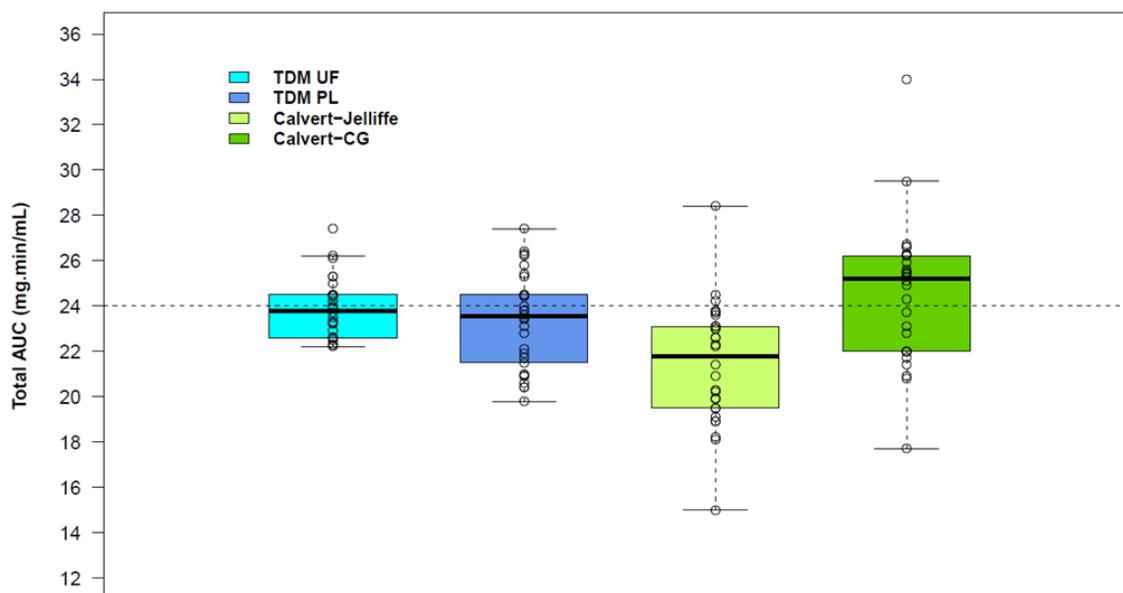
The results of the present analysis show the possibility of estimating CL_U of carboplatin from its total plasma concentrations instead of unbound concentrations; therefore making the implementation of Bayesian-based TDM feasible in centers where immediate ultrafiltration of plasma samples is not possible. We recommend the use of the relation: CL_U (L/h) = 1.15 CL_P (L/h) + 0.13; where CL_P is obtained by performing Bayesian analysis on total plasma carboplatin concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the French GPCO and GETUG Unicancer groups for their active contribution to the conduct of the multicenter TI-CE clinical study.

We thank the Fondation Pierre Fabre for financially supporting Sotheara Moeung (PhD student).

Supplementary data:



Supplementary Figure 1: Box plot of total observed or predicted carboplatin AUC (over 3 days) during cycle 1 for a target AUC of 24 mg.min/mL, in 30 HD patients of the prospective data set. In light blue is the box plot representing the distribution of total AUC where carboplatin TDM was performed using unbound concentrations; in dark blue, the distribution of AUC that would have been observed where carboplatin TDM was performed using total concentrations followed by the use of linear regression to obtain CL_U and in light and dark green, if the total dose had been calculated using the Calvert/Jelliffe or Calvert/Cockcroft-Gault (CG) equation, respectively.

REFERENCES

1. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, et al. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol.* 1989;7(11):1748-1756.
2. Chatelut E, Canal P, Brunner V, et al. Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(8):573-580.
3. Schmitt A, Gladiëff L, Lansiaux A, et al. A universal formula based on cystatin C to perform individual dosing of carboplatin in normal weight, underweight, and obese patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3633-3639.

4. Huitema AD, Mathôt RA, Tibben MM, Schellens JH, Rodenhuis S, Beijnen JH. Validation of techniques for the prediction of carboplatin exposure: application of Bayesian methods. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67(6):621-630.
5. Nagao S, Fujiwara K, Imafuku N, et al. Difference of carboplatin clearance estimated by the Cockcroft-Gault, Jelliffe, Modified-Jelliffe, Wright or Chatelut formula. *Gynecol Oncol.* 2005;99(2):327-333.
6. Veal GJ, Errington J, Hayden J, et al. Carboplatin therapeutic monitoring in preterm and full-term neonates. *Eur J Cancer.* 2015;51(14):2022-2030.
7. Rubie H, Doz F, Vassal G, et al. Individual dosing of carboplatin based on drug monitoring in children receiving high-dose chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2003;39(10):1433-1438.
8. de Jonge ME, Huitema ADR, Tukker AC, van Dam SM, Rodenhuis S, Beijnen JH. Accuracy, feasibility, and clinical impact of prospective Bayesian pharmacokinetically guided dosing of cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin in high-dose chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):273-283.
9. Chevreau C, Thomas F, Couteau C, Dalenc F, Mourey L, Chatelut E. Ototoxicity of High-Dose Carboplatin. *JCO.* 2005;23(15):3649-3650.
10. Moeung S, Chevreau C, Broutin S, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Carboplatin in High-Dose Protocol (TI-CE) for Advanced Germ Cell Tumors: Pharmacokinetic Results of a Phase II Multicenter Study. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7171-7179.
11. Erkmen K, Egorin MJ, Reyno LM, Morgan R, Doroshow JH. Effects of storage on the binding of carboplatin to plasma proteins. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;35(3):254-256.
12. Chatelut E, Pivot X, Otto J, et al. A limited sampling strategy for determining carboplatin AUC and monitoring drug dosage. *Eur J Cancer.* 2000;36(2):264-269.
13. LeRoy AF, Wehling ML, Sponseller HL, et al. Analysis of platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Biochem Med.* 1977;18(2):184-191.
14. Thomas F, Séronie-Vivien S, Gladieff L, et al. Cystatin C as a new covariate to predict renal elimination of drugs: application to carboplatin. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(12):1305-1316.
15. Urien S, Doz F, Namouni F, Bastian G. Pharmacokinetic modelling of total and unbound plasma carboplatin--a population study in 75 children. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40(6):270-278.
16. Jelliffe RW. Letter: Creatinine clearance: bedside estimate. *Ann Intern Med.* 1973;79(4):604-605.

17. Cockcroft DW, Gault H. Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *NEF*. 1976;16(1):31-41.
18. Joerger M, Huitema ADR, Richel DJ, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel and carboplatin in ovarian cancer patients: a study by the European organization for research and treatment of cancer-pharmacology and molecular mechanisms group and new drug development group. *Clin Cancer Res*. 2007;13(21):6410-6418.
19. van der Vijgh WJ, Klein I. Protein binding of five platinum compounds. Comparison of two ultrafiltration systems. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1986;18(2):129-132.
20. Sooriyaarachchi M, Narendran A, Gailer J. Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cis-platin and carboplatin in human plasma in vitro. *Metallomics*. 2011;3(1):49-55.

Table 1. Baseline characteristics of the 407 patients available for the analysis

Characteristics	Whole dataset (n = 407)	Development dataset ^a (n = 277)	Prospective dataset ^a (n = 130)
Age (years)	54 (20 - 83)	54 (20 - 83)	55 (21 - 83)
Body weight (kg)	67 (40 -150)	66 (40 -123)	69 (40 -150)
Serum creatinine (µM)	77 (25 - 433)	76 (36 - 244)	80 (25 - 433)
Serum cystatin C (mg/L) ^b	0.9 (0.4 - 3.5)	0.9 (0.4 - 2.1)	0.9 (0.5 - 3.5)
Body surface area (m ²)	1.74 (1.30 -2.85)	1.73 (1.33 – 2.37)	1.76 (1.30 – 2.85)
Total protein (g/L) ^c	68 (40 – 88)	68 (42 - 88)	68 (40 - 82)
Serum albumin (g/L) ^d	36 (13 – 60)	37 (13 – 50)	36 (17 – 60)
Sex (male/female)	167/240	108/169	59/71
High-dose/ Standard-dose	86/321	52/225 ^e	34/96 ^e

^a None of the characteristics differed significantly between the two dataset (Student's t-test and Pearson's chi-squared test).

^b Serum cystatin C level was available for only 405 patients (276 patients in development dataset and 129 in prospective dataset)

^c Total protein level was available for only 347 patients (239 patients in development dataset and 108 in prospective dataset)

^d Serum albumin level was available for only 319 patients (210 patients in development dataset and 109 in prospective dataset)

^e Proportion of patients from each study is not significantly different between the two datasets (Pearson's chi-squared test)

Table 2. Parameter estimates of the tricomp-model and tricomp-model containing significant covariates from the analysis of the total and unbound plasma concentrations of the development dataset.

Model PK parameters	Fixed-effect value [%RSE]	Random-effect value*
Tricomp-model		
		Interindividual variability
CL ₁₀ (L/h) = θ_1	$\theta_1 = 6.6 [2.7]$	31.3%
V ₁ (L) = $\theta_2 \times \text{BSA}$	$\theta_2 = 7.6 [1.8]$	22.2%
Q (L/h) = θ_3	$\theta_3 = 4.0 [2.7]$	— ^a
V ₂ (L) = $\theta_4 \times \text{BSA}$	$\theta_4 = 4.9 [8.8]$	81.9%
K ₁₃ (h ⁻¹) = θ_5	$\theta_5 = 0.042 [5.9]$	46.8%
K ₃₀ (h ⁻¹) = θ_6	$\theta_6 = 0.0038 [3.4]$	27.8%
V ₃ (L) = θ_7	$\theta_7 = 21 [6.2]$	— ^a
		Residual variability
Standard-dose study's unbound concentration		12.9%
High-dose study's unbound concentration		10.4%
Standard-dose study's total plasma concentration		15.6%
High-dose study total's plasma concentration		9.1%
Tricomp-model with significant covariates		
		Interindividual variability
CL ₁₀ (L/h) = $\theta_1 \times (\text{age}/54)^{\theta_2} \times (\text{CysC}/0.9)^{\theta_3} \times (\text{Scr}/76)^{\theta_4} \times (\text{BW}/66)^{\theta_5} \times \theta_6^{\text{sex}}$	$\theta_1 = 7.4 [3.2]$	16.7%
	$\theta_2 = -0.196 [22.8]$	
	$\theta_3 = -0.417 [10.2]$	
	$\theta_4 = -0.424 [12.1]$	
	$\theta_5 = 0.543 [10.1]$	
	$\theta_6 = 0.853 [3.4]$	
V ₁ (L) = $\theta_7 \times \text{BSA}$	$\theta_7 = 7.1 [2.4]$	22.6%
Q (L/h) = θ_8	$\theta_8 = 5.8 [8.6]$	— ^a
V ₂ (L) = $\theta_9 \times \text{BSA}$	$\theta_9 = 3.5 [5.5]$	45.9%
K ₁₃ (h ⁻¹) = θ_{10}	$\theta_{10} = 0.038 [32.4]$	48.3%
K ₃₀ (h ⁻¹) = θ_{11}	$\theta_{11} = 0.0037 [3.7]$	28.6%
V ₃ (L) = θ_{12}	$\theta_{12} = 18.1 [31.4]$	— ^a
		Residual variability
Standard-dose study's unbound concentration		12.2%
High-dose study's unbound concentration		9.7%
Standard-dose study's total plasma concentration		15.0%
High-dose study total's plasma concentration		9.5%

%RSE: percentage relative standard error

* Random-effect values are expressed in percentage of coefficient of variation (%CV).

^a Interindividual variability of Q and V₃ were fixed at 0 to allow model convergence.

Table 3. Parameter estimates of the two-compartment PK model from the analysis of the total plasma carboplatin concentrations of the development dataset.

Model PK parameters	Fixed-effect value [%RSE]	Random-effect value*
		Interindividual variability
CL (L/h) = θ_1	$\theta_1 = 6.0 [2.4]$	29.5 %
V_1 (L) = $\theta_2 \times \text{BSA}$	$\theta_2 = 7.3 [2.5]$	23.7 %
Q (L/h) = θ_3	$\theta_3 = 5.6 [4.2]$	— ^a
V_2 (L) = $\theta_4 \times \text{BSA}$	$\theta_4 = 5.4 [5.3]$	60.0 %
		Residual variability
		14.4 %

%RSE: percentage relative standard error

* Random-effect values are expressed in percentage of coefficient of variation (%CV)

^a Interindividual variability of Q was fixed at 0 to allow model convergence

Table 4. Prospective evaluation of the performance of different approaches in estimating unbound carboplatin clearance (CL_U)

Approach	MPE (%)	MAPE (%)	Minimum PE (%)	Maximum PE (%)	N
PK-model-only					
— <i>Tricomp-model</i>	+2.3	11.1	- 41.1	+30.9	130
Standard-dose study	+2.7	11.6	- 41.1	+30.9	96
High-dose study	+1.1	9.7	- 22.8	+25.0	34
— <i>Tricomp-model</i>					
<i>with covariates</i>	+6.3	11.4	- 32.7	+37.4	129
Standard-dose study	+5.2	11.5	- 32.7	+37.4	96
High-dose study	+9.7	11.2	- 5.6	+27.1	33
Linear regression					
Standard-dose study	+1.2	9.7	- 31.3	+33.4	130
High-dose study	+1.8	10.9	- 31.3	+33.4	96
High-dose study	- 0.6	6.3	- 14.0	+20.6	34

MPE = mean percentage error; **MAPE** = mean absolute percentage error;

PE = (Estimated CL_U – actual CL_U) x 100/actual CL_U

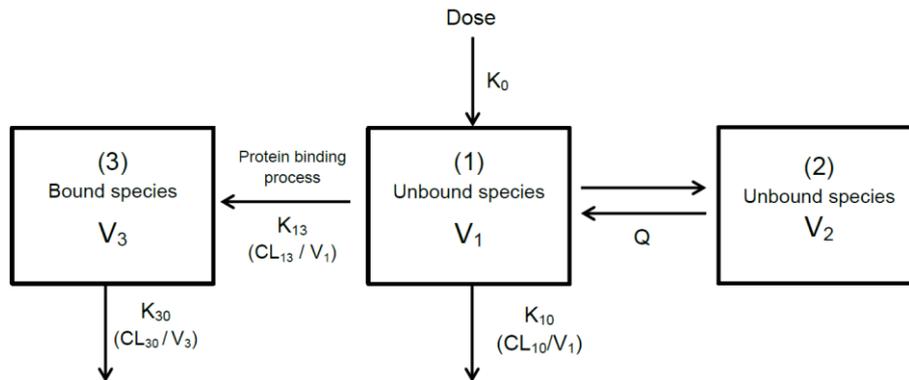


Figure 1. Schematic diagram of the three-compartment mammillary pharmacokinetic model. Carboplatin is administered as an intravenous infusion at K_0 rate. Unbound carboplatin can exchange between compartments (1) and (2), and can undergo irreversible binding to plasma proteins in compartment (1) to form protein-bound species in compartment (3). Q , CL_{10} , K_{10} , V_1 , V_2 : inter-compartmental clearance, elimination clearance, elimination rate constant, central volume of distribution and peripheral volume of distribution of the *unbound* species; CL_{13} , K_{13} : clearance and rate constant of protein binding process; CL_{30} , K_{30} , V_3 : elimination clearance, elimination rate constant and volume of distribution of the *bound* species.

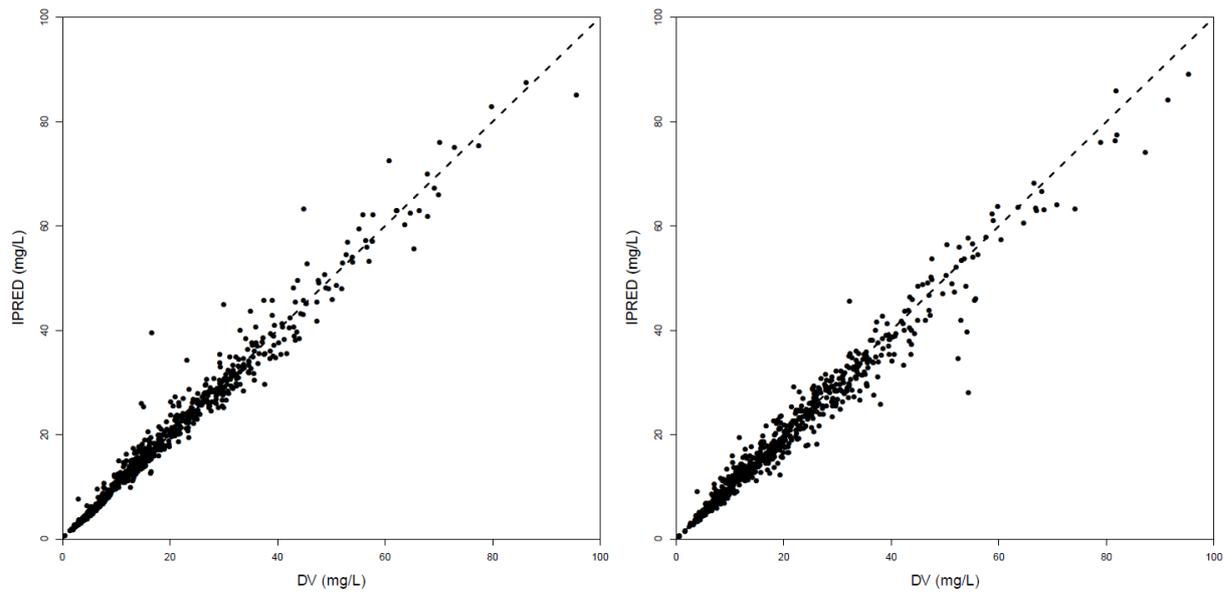


Figure 2. Goodness-of-fit plot [measured concentrations (DV) *versus* individual prediction concentrations (IPRED)] of the three-compartment mammillary PK model (tricom-model) for the *unbound* carboplatin concentrations (left) and the total plasma concentrations (right). The dashed lines represent the identity line ($y = x$).

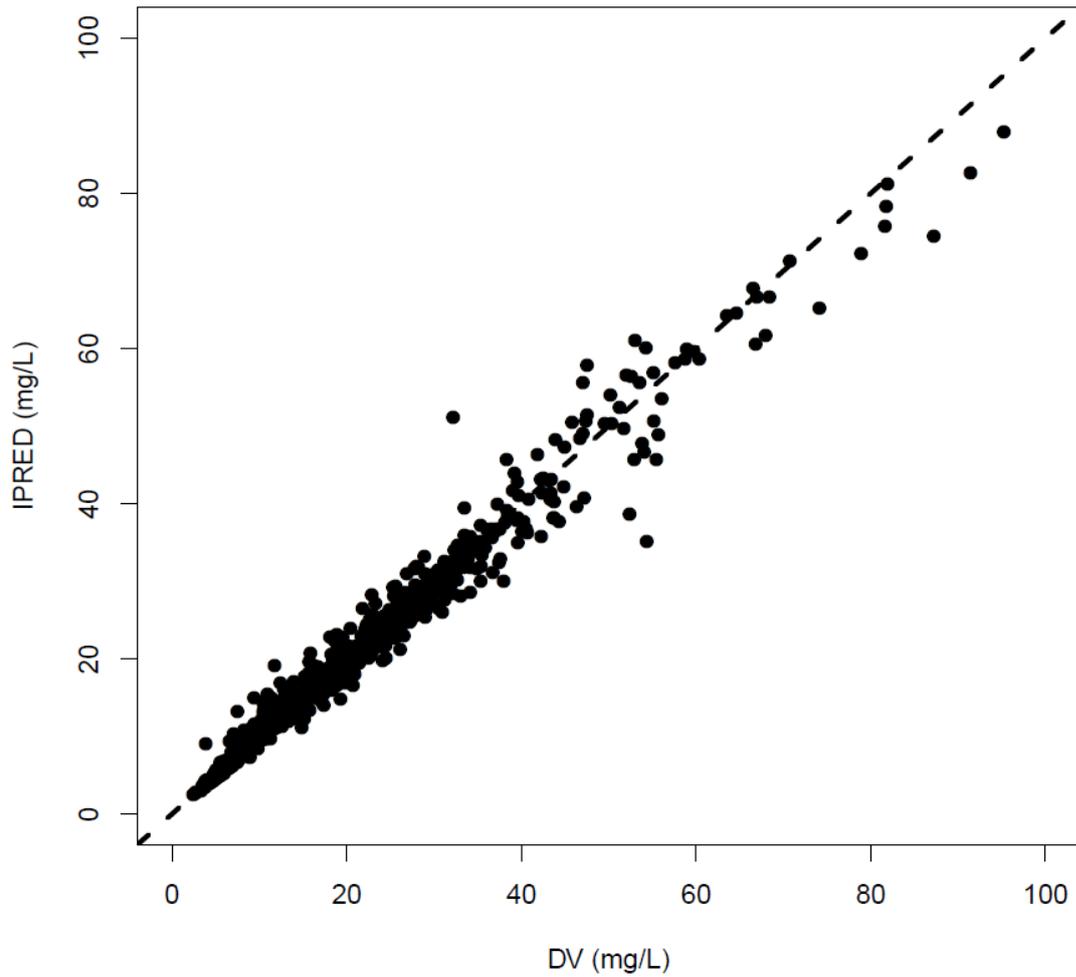


Figure 3. Goodness-of-fit plot [measured concentrations (DV) *versus* individual prediction concentrations (IPRED)] of the two-compartment PK model for the total plasma carboplatin concentrations. The dashed line represents the identity line ($y = x$).

I.C. Résultats complémentaires

Cette partie de thèse nous a permis de compléter les résultats des articles 1 et 2. D'abord, concernant la possibilité de réaliser le TDM à partir des seules concentrations PL, nous avons évalué la méthode par régression linéaire de façon prospective pour les cycles 2 et 3 des patients du protocole TICE. Ensuite, nous avons complété la comparaison des différentes méthodes : TDM (basé sur les concentrations UF) et méthode *a priori* (basées sur les seules covariables) en intégrant ce TDM basé sur les concentrations PL, à chaque cycle du traitement.

I.C.1. Evaluation prospective de l'équation de régression linéaire aux cycles 2 et 3

La performance de l'estimation de la CL_{UF} à partir des concentrations PL par la méthode de la régression linéaire a été évaluée chez les patients TICE du dataset prospectif de l'article n° 2 aux cycles 2 (n=28) et 3 (n=25). Les résultats sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Evaluation prospective de la méthode d'estimation de la CL_{UF} à partir des concentrations plasmatiques totales par l'équation $CL_{UF}=1,15 CL_{PL} + 0,13$ chez les patients TICE aux cycles 2 et 3.

	MPE (%)	MAPE (%)	Minimum PE (%)	Maximum PE (%)	N
Cycle 2	-5,6	8,7	-22,6	+9,9	28
Cycle 3	-7,3	9,6	-30,7	+10,2	25

I.C.2. Comparaison entre différentes méthodes d'adaptation de doses

Le pourcentage d'erreur (PE) a été calculé entre la dose idéale et la dose totale par cycle obtenues par différentes méthodes : TDM basé sur les concentrations UF, TDM basé sur les concentrations PL, formule TICE 3-cov, formules Calvert-Jelliffe et Calvert-Cockcroft-Gault (Calvert-CG). La dose idéale était celle qui permettrait d'atteindre l'AUC cible totale sur 3 jours si la clairance de chaque jour était connue. Le calcul a été réalisé chez les patients TICE qui étaient à la fois dans le dataset prospectif du 1^{er} article et dans celui du 2^{ème} (n=11 patients) pour permettre la prise en compte de la formule TICE 3-cov dans l'évaluation. Le résultat est présenté dans la Figure 12.

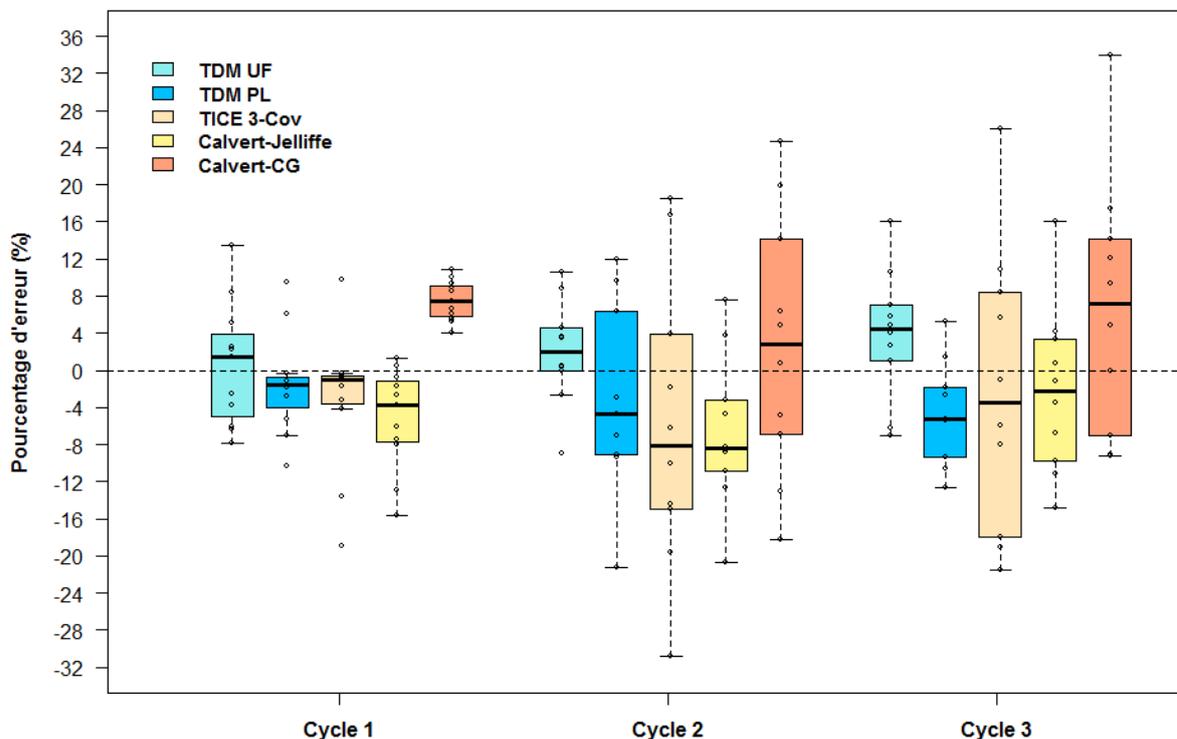


Figure 12. Box plot de pourcentages d'erreur (%PE) entre la dose idéale et la dose obtenue à chaque cycle par différentes méthodes : TDM basé sur les concentrations UF du carboplatine, TDM basé sur les concentrations PL, utilisation de la formule TICE 3-cov, Calvert-Jelliffe ou Calvert-Cockcroft-Gault. La dose idéale est celle qui permettrait d'atteindre l'AUC cible totale sur 3 jours si la clairance de chaque jour était connue (n=11 patients).

I.C.3. Bénéfice du TDM sur la réponse et la toxicité du protocole TICE

Le bénéfice attendu de cette étude était une augmentation de l'efficacité du protocole TICE grâce à l'adaptation individuelle des doses de carboplatine tout en contrôlant la toxicité et en particulier la toxicité auditive.

Les résultats d'efficacité n'ont pas encore été publiés mais ont fait l'objet d'une communication lors du congrès ASCO GU en février 2017 par le Dr.Christine Chevreau¹⁷⁰. Parmi les 79 patients évaluables pour la réponse, 35 ont obtenu une réponse complète soit un taux de réponse complète de 45%. En tenant compte des patients qui ont obtenu une réponse partielle avec négativation des marqueurs (PRm-), nous atteignons 70% de réponse favorable.

Les taux de réponse obtenus dans les précédentes études évaluant le protocole TICE étaient d'environ 55%¹⁶³⁻¹⁶⁵, ce qui montre que les résultats de notre étude ne paraissent pas meilleurs en termes d'efficacité. Cependant, il semble que notre population contenait plus de patients de mauvais pronostic, et il est compliqué de comparer nos résultats à ceux précédemment publiés.

Pour ce qui concerne la toxicité, il a finalement été assez décevant de ne pas avoir de critères objectifs pour prouver la meilleure tolérance de ce protocole adapté. En effet, la toxicité hématologique est présente chez quasiment tous les patients du fait de l'intensification, et les données biologiques recueillies n'étaient pas assez complètes pour évaluer de manière fine la tolérance hématologique (e.g., le temps pour atteindre un taux normal de polynucléaires neutrophiles durant l'intercycle ou le nombre d'hospitalisations pour neutropénie fébrile). Concernant l'ototoxicité, bien que des audiogrammes aient été programmés dans l'essai, nous avons été confrontés à un certain nombre de données manquantes. Les résultats seront présentés dans la partie III. Pareillement, il s'avère difficile de statuer sur un apport du TDM pour limiter l'ototoxicité car très peu d'essais portant sur le protocole TICE ont fait état de la fréquence et du grade de sévérité de la surdité.

I.D. Discussion

Dans un protocole de haute dose, une parfaite maîtrise de l'exposition est primordiale afin de prévenir une toxicité excessive ou une sous-exposition qui peuvent entraver l'efficacité du traitement pour un cancer curable tel que le cancer germinifère. Cela justifie donc un TDM du carboplatine utilisé dans le protocole TICE. En outre, son schéma d'administration de 3 jours consécutifs par cycle dans ce protocole permet d'enlever la contrainte à la réalisation du TDM posée par le schéma classique « jour 1=jour 21 ».

Dans l'essai TICE, pour des raisons logistiques, l'adaptation de dose à chaque cycle a été effectuée au jour 3, et une même dose est administrée aux jours 1 et 2. Au cycle 1, cette dose a été calculée en fonction de la clairance prédite par l'équation issue de nos travaux les plus récents⁸⁹ qui ne contient pas la cystatine C. Comme expliqué dans l'article, la raison était que cette protéine n'est pas dosée dans tous les centres participant à l'étude. L'analyse bayésienne a permis, à partir de 3 prélèvements sanguins au jour 1, la détermination de la CL_{UF} observée en fonction de laquelle la dose du jour 3 a été adaptée. Aux cycles 2 et 3, la dose des jours 1 et 2 a été calculée en utilisant la clairance observée du jour 1 du cycle précédent à condition que la créatinine sérique n'ait pas augmenté de plus de 30% durant l'intercycle.

Le TDM du carboplatine basé sur l'estimation bayésienne des clairances individuelles a été déjà réalisé par de Jonge et al.¹⁷¹ pour un protocole de haute dose associant le cyclophosphamide, le thiotépa et le carboplatine (protocole CTC). Ils ont montré une réduction importante de la variabilité interindividuelle de l'exposition au carboplatine, et l'AUC cible a été atteinte avec plus de précision que si l'adaptation de dose n'avait pas été réalisée (13% *versus* 30%).

Les analyses PK effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis de démontrer, dans l'article n° 1, la faisabilité du TDM ainsi que sa performance dans la maîtrise de l'AUC du carboplatine utilisé dans le protocole TICE. En effet, l'AUC moyenne par cycle était de 24.4 mg.min/mL (22.4 et 26.8 pour les 10^{ème} et 90^{ème} centiles respectivement). Une variation statistiquement significative de la clairance au cours des 3 jours de chaque cycle a été observée mais, globalement, cette variation était modeste (< 9%) et sans impact significatif sur les performances du TDM. En revanche, la diminution de la clairance du cycle 1 au cycle 3

était statistiquement et cliniquement significative. Par conséquent, la dose au jour 3 a été diminuée pour certains patients aux cycles 2 et 3 bien que la dose ait été déjà calculée selon la clairance observée au jour 1 du cycle précédent. Ce résultat souligne la nécessité de réaliser le TDM non seulement au cycle 1 mais aussi durant les cycles suivants.

Bien que la cystatine C soit une covariable significativement corrélée aux capacités d'élimination du carboplatine (i.e., son élimination du modèle à 4 covariables était associée à $\Delta OFV > +8.3$), le bénéfice de l'associer à la créatininémie était faible par rapport à ce qui a été observée dans les études précédentes^{89,97}. Cette observation pourrait être expliquée par la nature de la population de patients traités par ce protocole (jeunes hommes ayant une fonction rénale relativement normale). Bien que la formule soit adaptée aux patients recevant le protocole TICE, l'évaluation prospective a montré que sa performance était inférieure à celle du TDM.

Il faut aussi noter que la formule Calvert-Jelliffe, comme notre formule TICE 3-cov ne présentait pas de biais de prédiction alors que la formule Calvert-Cockcroft-Gault surestimait la clairance. Cependant, une évaluation portant sur les 89 patients de l'étude a montré que la formule Calvert-Jelliffe avait une tendance à sous-exposer les patients au cycle 1 (valeur médiane de l'AUC de 22.7 mg.min/mL) avec environ 10% des patients qui auraient eu une AUC inférieure à 18 pour l'AUC cible de 24 mg.min/mL. Néanmoins, aux cycles 2 et 3, comme indiqué dans la Figure 1 de l'article n°1, les performances de notre formule TICE 3-cov et Calvert-Jelliffe sont identiques. La Figure 12 ci-dessus, réalisée sur un effectif très réduit de patients (n=11) semble même indiquer que l'utilisation de la formule 3-cov s'accompagnerait de valeurs extrêmes d'erreurs commises pour le calcul de la dose plus importantes qu'avec Calvert-Jelliffe. Des évaluations prospectives supplémentaires seront nécessaires pour pouvoir comparer la performance entre la formule TICE 3-cov et celle de Calvert-Jelliffe.

Le résultat de l'article n°2 montre qu'il est possible d'estimer la CL_{UF} à partir des concentrations PL lorsque l'ultrafiltration des prélèvements plasmatiques ne peut pas être réalisée. En raison de la simplicité de la méthode basée sur l'équation de la régression linéaire, nous avons recommandé son utilisation bien qu'elle ne soit que légèrement meilleure à celle basée sur le modèle de PK-pop intégrant les concentrations UF et PL. Chez les patients TICE, l'estimation de la CL_{UF} au cycle 1 était associée à une bonne précision (MAPE = 6.3%) avec seulement un des 34 patients ayant le PE absolu supérieur à 20%. Cependant,

bien qu'aucun biais n'ait été observé au cycle 1, celui-ci semble apparaître aux cycles 2 et 3 avec des pourcentages d'erreur atteignant même -30% au cycle 3 pour un patient (Tableau 1). Les MAPE augmentent légèrement mais restent inférieures à 10%.

La Figure 12 montre que les performances respectives de différentes méthodes peuvent varier d'un cycle à l'autre mais que, globalement, le TDM basé sur les concentrations UF représente la meilleure méthode pour maîtriser l'AUC du carboplatine. Dans le cas absolu où l'ultrafiltration n'est pas réalisable ou une ou plusieurs concentrations UF sont manquantes, le TDM basé sur les concentrations PL peut être envisagé comme une alternative. Enfin, en l'absence de possibilité pour effectuer le TDM, les deux équations (Calvert-Jelliffe et TICE 3-cov) peuvent être utilisées pour le calcul de doses.

En conclusion, même si les résultats d'efficacité ou de tolérance ne permettent pas d'afficher un bénéfice de ce protocole individualisé, les résultats PK ainsi que la démonstration de la faisabilité de cette approche ont convaincu certains oncologues de continuer à pratiquer ce TDM en dehors de l'essai, pour s'assurer de la bonne exposition de leurs patients.

II. ANALYSE PHARMACOGENETIQUE DE L'OTOTOXICITE DU CARBOPLATINE

II.A. Introduction

L'efficacité de la chimiothérapie à base de platine est souvent compromise par une toxicité auditive importante. En effet, une surdité bilatérale permanente a été observée chez 10 à 25% des patients traités par le cisplatine et cet effet est plus prononcé chez les enfants¹⁷². Elle survient dès 72 heures après le traitement voire plusieurs jours plus tard¹⁷³. La perte auditive se produit, dans un premier temps, aux hautes fréquences et ensuite progresse vers les fréquences basses lorsque le traitement est poursuivi. Les cellules ciliées de l'organe de Corti et les cellules du ganglion spiral et de la strie vasculaire de la cochlée sont sélectivement touchées. Le cisplatine provoque une apoptose de ces cellules, principalement, par génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS)¹⁷⁴ (Figure 13).

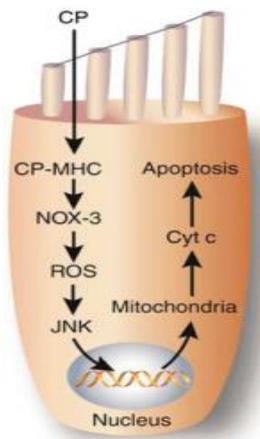


Figure 13. Mécanisme de l'ototoxicité du cisplatine. Le cisplatine (CP) entre dans une cellule ciliée par les canaux de mécano-transduction. Il peut former un complexe monohydraté (MHC) qui le rend plus réactif. Le CP et/ou le MHC peuvent activer le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase 3 (NOX-3) entraînant la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS peuvent ensuite activer les "*c-Jun N-terminal kinases*" (JNK) qui peuvent activer les gènes impliqués dans la mort cellulaire. Les produits de l'expression de ces gènes migrent vers les mitochondries, entraînant ensuite la libération des cytochromes c (Cyt c) et déclenchant l'apoptose par un mécanisme caspase-dépendant.¹⁷⁴

La variabilité interindividuelle de la susceptibilité à l'ototoxicité du cisplatine (particulièrement importante comparativement à celle de sa pharmacocinétique qui est limitée)¹⁷⁵ a mené à une hypothèse que des facteurs génétiques pourraient être impliqués dans cette toxicité. En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'association entre des polymorphismes mononucléotidiques (ou SNP pour « Single Nucleotide Polymorphism ») de certains gènes et l'ototoxicité du cisplatine. Ce sont des gènes codant pour des protéines impliquées dans le mécanisme de réparation des adduits de platine ou de détoxification des ROS, dans le transport et dans le métabolisme de ce médicament¹⁷⁶.

Si l'ototoxicité est bien connue pour le cisplatine, elle n'est pas habituellement observée pour le carboplatine utilisé aux doses conventionnelles sauf chez les enfants traités pour un rétinoblastome^{177,178}. En revanche, elle constitue la toxicité dose-limitante de différents protocoles de hautes doses de carboplatine^{166,167,169} dont le protocole TICE¹⁶⁸. Durant notre essai de phase II, la limitation de cette ototoxicité par la maîtrise des AUCs de carboplatine figurait parmi les objectifs de l'étude, et c'est ainsi que des audiogrammes ont été programmés avant et après le traitement. De plus, la maîtrise attendue de l'exposition au carboplatine confère à cette étude une situation idéale pour étudier l'impact de facteurs génétiques dans la survenue et la gravité de la surdité liée au carboplatine.

L'objectif de notre analyse est donc, d'une part, de reporter l'incidence et la gravité de l'ototoxicité et, d'autre part, d'étudier l'implication de polymorphismes génétiques dans l'ototoxicité des patients de notre essai. Pour cela, nous avons sélectionné un certain nombre de polymorphismes génétiques dont l'association avec l'ototoxicité du cisplatine avait été suggérée dans des études pharmacogénétiques (Tableau 2). Ils correspondent, pour certains, à des gènes codant pour des protéines impliquées dans la pharmacocinétique et la pharmacologie du cisplatine : enzymes de détoxification, transporteurs, récepteurs et protéines du système de réparation de l'ADN. En plus de ces gènes, le polymorphisme de certains autres gènes dont les variations pourraient potentiellement influencer le transport du platine ont été également étudiés : ATP7A, ATP7B, PXR et ABCC3. Le choix des SNPs pour ATP7A et PXR a été guidé par la bibliographie disponible, la fréquence de l'allèle mineur (SNPs rares écartés) et la fonctionnalité si celle-ci était connue. Pour ATP7B, nous avons utilisé la fonction « Tagger » dans Haploview¹⁷⁹ qui permet de sélectionner les SNPs marqueurs les plus représentatifs de la variabilité du gène, en évitant par exemple de

sélectionner des SNPs qui seraient tous en « linkage disequilibrium » complet (donc peu informatifs) et en retenant ceux qui, grâce à une bonne corrélation avec d'autres SNPs non génotypés (R^2 proche de 1) permettront de capturer un maximum de variabilité sur le gène .

Tableau 2. Polymorphismes génétiques décrits pour leur implication dans l'ototoxicité du cisplatine et sélectionnés pour cette étude.

Gène	Polymorphisme	Allèle majeur/mineur	Conséquence	Références
TPMT	rs12201199	T/A	Allèle A : Toxicité accrue	172,180
TPMT*2 (Exon 5)	^a rs1800462 (238G>C)	G/C		
TPMT*3B (Exon 7)	rs1800460 (460C>T)	G/A	Allèle A : Toxicité accrue	180,181
TPMT*3C (Exon 10)	rs1142345 (719T>C)	A/G	Allèle G : Toxicité accrue	180,181
COMT	rs4646316	C/T	Allèle T : Protection	172,180
	rs9332377	C/T	Allèle T : Toxicité accrue	172,180,182
LRP2 (mégaline)	rs2075252 (c.12280A>G)	G/A	Allèle A : Toxicité accrue	183
XPC	rs2228001 (c.2815T>G)	T/G	Allèle G : Toxicité accrue	184
CTR1	rs10981694	T/G	Allèle G : Toxicité accrue	185
ACYP2	rs1872328	G/A	Allèle A : Toxicité accrue	186–189
GSTT1		Délétion du gène	Protection Toxicité accrue	182,190,191 192
OCT2	rs316019 (c.808G>T)	G/T	Allèle T : Protection	193

^a Il n'existe pas d'étude évaluant l'association entre TPMT*2 et l'ototoxicité, mais le SNP a été sélectionné car il est associé à une diminution de l'activité de l'enzyme¹⁹⁴ comme le TPMT*3B et *3C.

Nous décrivons plus en détail ci-dessous les raisons qui nous ont justifié le choix de ces différents gènes.

Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), catéchol O-méthyltransférase (COMT) et glutathion-S-transférase thêta 1 (GSTT1) : TPMT et COMT sont des méthyl-transférases impliquées dans le métabolisme, respectivement, des thiopurines et des catéchols. Ils dépendent du S-adénosylméthionine (SAM) qui est un substrat donneur du groupement « méthyl ». Le mécanisme par lequel le polymorphisme de ces gènes serait impliqué dans l'ototoxicité n'a pas été bien établi. Une hypothèse est que l'ototoxicité du cisplatine serait liée à une accumulation du SAM provoquée par une activité diminuée des TPMT et COMT^{172,182}. En effet, il a été observé que l'inhibition *in vitro* de la transméthylation SAM-dépendante augmentait la toxicité au cisplatine¹⁹⁵ et que, chez les animaux recevant le cisplatine, une aggravation de l'insuffisance rénale a été induite par SAM¹⁹⁶. En outre, une diminution de l'activité de la TPMT pourrait entraîner une diminution de l'inactivation des complexes cisplatine-purine et ainsi augmenter l'efficacité de la formation des adduits de platine et la toxicité du cisplatine dans les cellules ciliées^{172,197}.

GSTT1 est une enzyme du métabolisme de phase II dont la fonction est de catalyser la conjugaison des substrats électrophiles au glutathion. Elle a aussi une activité anti-radicalaire permettant de protéger les cellules contre les effets délétères du stress oxydatif. Le gène est absent [i.e., génotype « null » ou (-)] chez 25-40% des individus, pouvant entraîner une augmentation de la susceptibilité des cellules au stress oxydant¹⁹⁸.

Acylphosphatase 2 (ACYP2) est une enzyme impliquée dans l'hydrolyse des intermédiaires phosphoenzymes de différentes pompes ioniques surtout la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase avec donc un effet potentiel sur l'homéostasie de Ca^{2+} ¹⁹⁹. Cette enzyme est présente dans les cellules musculaires et dans la cochlée. Le mécanisme exact de son implication dans l'ototoxicité n'est pas encore bien connu, mais il a été montré que la signalisation calcique ATP-dépendante est essentielle pour le développement des cellules ciliées²⁰⁰.

Xeroderma Pigmentosum, Complementation group C (XPC) est une protéine nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN induites par le cisplatine impliquant le système de réparation par excision de nucléotide (ou NER pour « Nucleotide Excision Repair »)²⁰¹. La translocation

d'XPC du cytoplasme vers le noyau a été observée dans la cochlée des rats traités par le cisplatine²⁰².

Low-density lipoprotein-Related Protein 2 (LRP2) ou Mégaline est un récepteur multifonctionnel appartenant à la famille des lipoprotéines de basse densité. Ils sont abondants dans les reins et dans la strie vasculaire de la cochlée. Au niveau des tubules rénaux proximaux, le récepteur est impliqué dans la réabsorption de différentes molécules. Elle joue aussi un rôle de récepteur endocytique vis-à-vis de certains ligands tels que les protéines qui transportent des vitamines et des hormones. Il a été montré que la mégaline transporte les aminosides²⁰³ qui, comme le cisplatine, sont des composés néphro- et ototoxiques. La présence de la mégaline au niveau de la strie vasculaire pourrait donc être impliquée dans la sensibilité de ces organes à la toxicité du cisplatine¹⁸³.

Organic Cation Transporter 2 (OCT2) est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des transporteurs des cations organiques (OCT de 1 à 3). Ces transporteurs sont principalement localisés dans les organes d'excrétion tels que le foie et les reins²⁰⁴. Il est aussi exprimé dans les cellules ciliées de l'organe de Corti et dans les cellules de la strie vasculaire de la cochlée des souris²⁰⁵. Il a été montré *in vitro* que ce transporteur est impliqué dans le transport du cisplatine à l'intérieur de la cellule. En outre, les modèles *in vivo* ont montré son implication dans l'ototoxicité du cisplatine, effet qui pouvait être supprimé en présence d'autre substrat du transporteur OCT2²⁰⁶.

Copper Transporter 1 (CTR1), ATPase copper transporter alpha (ATP7A) et bêta (ATP7B) : CTR1 ou SLC31A1 (« Solute Carrier family 31, member 1 ») est un récepteur transmembranaire impliqué dans le transport du cuivre monovalent (Cu⁺) à l'intérieur de la cellule. Il a été montré que le cisplatine se lie aussi à ce récepteur (probablement au même site que le Cu⁺) pour entrer dans les cellules²⁰⁷ (Figure 14). En outre, les études *in vitro* ont montré que ce transporteur est exprimé dans la cochlée, plus spécifiquement, au niveau des cellules ciliées, de la strie vasculaire et des neurones des ganglions spiraux. L'administration du sulfate de cuivre, un substrat du CTR1, par voie intra-tympanique protège contre la perte auditive induite par le cisplatine chez les souris²⁰⁸.

ATP7A et 7B sont des transporteurs de cuivre ATPase de type P. Contrairement à CTR1, ils jouent un rôle important dans la régulation du niveau de cuivre intracellulaire en assurant son efflux en dehors de la cellule ou sa distribution dans des compartiments cellulaires. Il a été montré que ces transporteurs sont également impliqués dans le transport, la distribution intracellulaire et l'efflux du cisplatine et de ses analogues²⁰⁹. Des travaux réalisés sur des cultures organotypiques de cochlée chez le rat ont montré qu'ATP7B était localisé au niveau

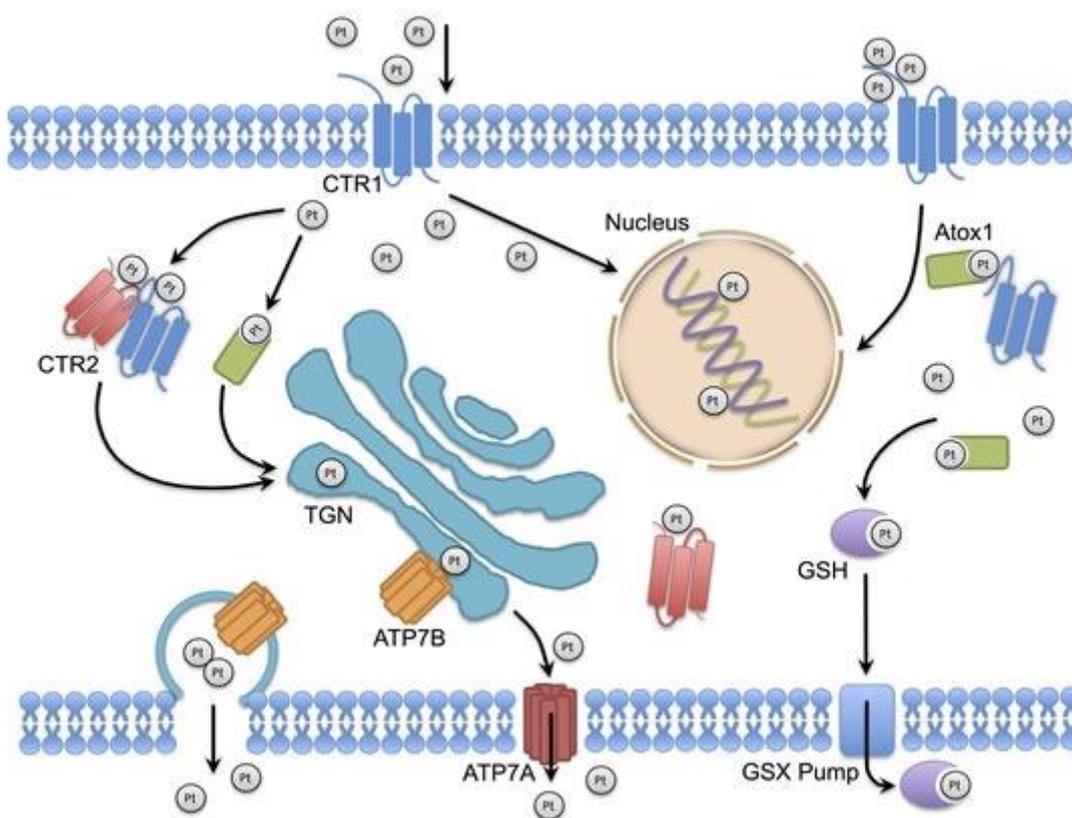


Figure 14. Rôle du système d'homéostasie du cuivre dans le transport et l'efflux des dérivés de platine.

Les dérivés de platine entrent dans les cellules par un transport actif assuré par CTR1. CTR1 et CTR2 acheminent le platine vers les chaperons moléculaires, les organelles cellulaires et les cibles médicamenteuses pour procéder à la distribution du platine ou initier des voies biologiques (telles que la voie cytotoxique et la voie de détoxication). ATP7A et ATP7B régulent la distribution subcellulaire cytosolique du platine via le réseau trans-Golgi et interviennent dans l'élimination des complexes cellulaires de platine. **CTR1** : copper transporter 1; **CTR2** : copper transporter 2; **ATP7A** : copper-transporting p-type adenosine triphosphatases 1; **ATP7B** : copper-transporting p-type adenosine triphosphatases 2; **TGN** : trans Golgi network; **GSH** : glutathion; **Atox1** : human antioxidant protein 1; **GSX pump** : glutathione S-conjugate pump.²¹⁰

des cellules ciliées alors qu'ATP7A était plus représenté au niveau des cellules de soutien (« pillar cells ») de l'organe de Corti. Bien qu'aucune étude pharmacogénétique de l'ototoxicité ne se soit intéressée à des variants de ces gènes, nous les avons inclus dans notre étude compte tenu de leur rôle dans le transport du platine et leur localisation.

ABCC2 (ou MRP2 pour « Multidrug Resistant associated Protein 2 ») et ABCC3 : ce sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). Cette famille de transporteurs est constituée de 7 sous-familles (transporteurs ABC de A à G) et exprimée essentiellement dans le foie, l'intestin, la barrière hémato-encéphalique, le placenta et les reins²¹¹. Ils sont impliqués dans le phénomène d'efflux de nombreux médicaments à l'origine du phénomène de résistance ou de l'élimination de ces médicaments. Le cisplatine n'a pas encore été décrit comme un substrat d'ABCC3, mais ABCC2 pourrait être impliqué dans l'efflux du cisplatine conjugué au glutathion²¹². En 2013, l'étude de Pussegoda et al.¹⁸⁰ a montré que le variant rs1051640 (E1503E) d'ABCC3 était associé à la survenue de la surdité induite au cisplatine.

Pregnane X Receptor (PXR) ou nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 (NR1I2) est un récepteur nucléaire qui régule l'expression des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques²¹³. Son activation est accompagnée d'une induction des enzymes du métabolisme de phase I (les cytochromes P450 : CYP2B6, CYP2B9, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 and CYP3A7), de phase II (GST, UDP-glucuronosyltransférase, sulfotransférases ...) ainsi que des transporteurs ABCB1 ou P-gp (« P-glycoprotein »), ABCC2 et OATP2 (« organic anion transporter polypeptide 2 »)²¹⁴.

II.B. Matériels et méthodes

II.B.1. Détermination du génotype des patients

L'ADN des patients a été extrait à partir de prélèvements sanguins selon les procédures de l'EZ1 DNA blood kit et l'EZ1 Advanced instrument (Qiagen, Chatsworth, CA). Le génotype de chaque polymorphisme génétique a été déterminé selon les différentes méthodes : discrimination allélique en PCR (« Polymerase Chain Reaction ») à l'aide des sondes Taqman, PCR multiplexe et séquençage (Tableau 3).

La PCR Taqman a été effectuée selon les instructions du fabricant (ThermoFischer). Pour ABCC2 (rs717620), la région d'intérêt a été amplifiée par PCR en utilisant le Hotstart Taq Master mix (Qiagen) selon les instructions du fabricant et séquencée pour la détermination du génotype. Une séquence de l'amorce M13 a été intégrée à l'extrémité 5' de toutes les amorces de PCR (présentées dans le Tableau 3) pour faciliter ensuite le séquençage de l'ADN. Les produits de PCR ont été séquencés en utilisant le Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) et les amorces M13 sens et anti-sens. Enfin, les produits ont été analysés par le ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Le génotype du GSTT1 a été déterminé par PCR multiplexe telle que décrite par Buchard A et al.²¹⁵. La région du gène et celle correspondant à la délétion du gène sont amplifiées en utilisant le Hotstart Taq Master mix (Qiagen) en présence des amorces spécifiques à chaque région (Tableau 3). Les amorces correspondant à la délétion du gène ne permettent l'amplification que si le gène est absent avec un amplicon généré de 3106 bp. Si le gène est présent, l'amplicon est trop grand pour être amplifié avec ce couple d'amorces et il n'y a pas d'amplicon. En revanche, les amorces positionnées dans le gène donnent un amplicon de 969 bp (Figure 15). La PCR se déroule de la manière suivante : dénaturation de 3 minutes à 94°C suivie par 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes et d'hybridation/élongation à 68°C pendant 7 minutes. L'élongation finale s'effectue à 72°C pendant 10 minutes et ensuite les produits de PCR sont gardés à 12°C. Les amplicons sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, préalablement coloré par SYBR™ Green I (Thermo Fisher®), dans du tampon TBE (BioRad) à 80V pendant 45 minutes. Enfin, le gel est photographié au moyen d'un UV transilluminator (Gene Flash, Syngene Bioimaging).

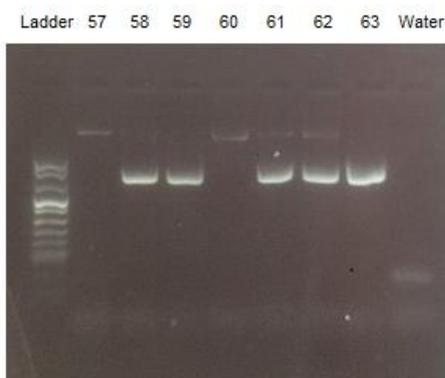


Figure 15. Electrophorèse suite à la PCR multiplexe de GSTT1 sur gel d'agarose à 2%.

Echantillons 57 et 60 sont homozygotes négatifs pour le gène (absence des 2 copies du gène) ; échantillons 58, 59 et 63 sont homozygotes positifs (présence des 2 copies du gène) ; échantillon 61 et 62 sont hétérozygotes.

Tableau 3 : Méthodes de génotypage pour les polymorphismes génétiques étudiés

Gènes	Polymorphisme	Méthode	Taqman assay ou amorce
TPMT	rs12201199	Taqman	C__31923406_10
	rs1800462	Taqman	C__12091552_30
	rs1800460	Taqman	C__30634116_20
	rs1142345	Taqman	C____19567_20
COMT	rs4646316	Taqman	C__29193982_10
	rs9332377	Taqman	C__29614343_10
LRP2	rs2075252	Taqman	C__16165996_10
XPC	rs2228001	Taqman	C____234284_1_
CTR1	rs10981694	Taqman	C__32121596_10
ACYP2	rs1872328	Taqman	C__11643398_10
GSTT1	Délétion	PCR Multiplexe	<i>Zone du gène:</i> Sens : 5'-TCTTTTGCATAGAGACCATGACCAG-3' Anti-sens : 5'-CTCCCTACTCCAGTAACTCCCGACT-3' <i>Zone correspondant à la délétion du gène:</i> Sens : 5'-GAAGCCCAAGAATGGGTGTGTGTG-3' Anti-sens : 5'-TGTCCCATGGCCTCCAACATT-3'
OCT2	rs316019	Taqman	C__3111809_20
ATP7A	rs2227291	Taqman	C__12118534_30
ATP7B	rs942463	Taqman	C__8714014_10
	rs9526820	Taqman	C__30473233_10
	rs1886538	Taqman	C__3126211_20
	rs2181891	Taqman	C__15843606_10
ABCC2	rs717620	Séquençage	Sens : 5'-CCTTTACGGAGAGAACATCAGA-3' Anti-sens : 5'-TTCTGGTTCTTGTGTGAC-3'
	rs8187710	Taqman	C__22272567_30
PXR	rs10934498	Taqman	C__1834252_10
	rs2472677	Taqman	C__26079845_10
	rs1523130	Taqman	C__9152783_20
	rs1523127	Taqman	C____263841_20
	rs3814055	Taqman	C__27504984_30
ABCC3	rs4793665	Taqman	C__27829307_10

II.B.2. Evaluation auditive et définition des paramètres auditifs

Un audiogramme pour chaque patient devait être réalisé à trois reprises durant le traitement : à l'inclusion (« baseline » avant les cycles de paclitaxel/Ifosfamide), avant le cycle 1 (C1) de la phase d'intensification et avant le cycle 3 (C3, soit après 2 cycles de carboplatine). Chez certains patients, l'audiogramme a été effectué après la fin de traitement (i.e., après 3 cycles de carboplatine).

Durant l'audiogramme, le seuil auditif (intensité en dB la plus basse à laquelle le sujet perçoit les sons purs) a été mesuré à différentes fréquences (500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 4000Hz, 8000Hz) pour les deux oreilles. A partir de ces données, le PTA4 (« pure tone audiometry à 4000Hz ») a été calculé : il s'agit de la moyenne des seuils à 500Hz, 1000Hz, 2000Hz et 3000Hz qui constitue une référence pour juger de l'audition globale (sons aigus ou graves). Le PTA4 a été calculé pour chaque oreille ainsi que le PTA4 moyen entre les deux oreilles. L'ototoxicité des dérivés de platine se manifestant tout particulièrement sur les fréquences aiguës, un deuxième paramètre a été calculé pour rendre compte de l'atteinte chimiotoxique : il s'agit de la moyenne entre les seuils obtenus à 4000Hz et 8000Hz (m4000-8000). Cette moyenne a été calculée pour chaque oreille puis la moyenne des deux oreilles a été obtenue. Qu'il s'agisse du PTA4 ou du m4000-8000, l'étude de ces paramètres moyens sur les deux oreilles reflète l'audition globale des patients mais peut masquer une atteinte asymétrique. C'est pourquoi nous avons également conservé les résultats obtenus pour chaque oreille en considérant l'oreille la plus atteinte.

Dans certains cas, l'audiogramme a été réalisé mais n'a pas été archivé dans le dossier patient et seul le compte-rendu réalisé par le médecin était disponible. Les données des audiogrammes ainsi que des compte-rendus ont permis de grader la toxicité auditive selon le CTCAE version 4 (« Common Terminology Criteria for Adverse Events ») pour chaque bilan auditif (i.e., à baseline, avant le C1, avant le C3 et/ou post-traitement). Les différentes variables qui ont donc été considérées comme paramètres auditifs à évaluer sont :

- Grade CTCAE de l'ototoxicité
- PTA4 moyen entre les deux oreilles
- PTA4 de l'oreille la plus atteinte
- m4000-8000 moyen entre les deux oreilles

- m4000-8000 de l'oreille la plus atteinte

L'évolution de ces paramètres entre le temps « pré-carbo » et « post-carbo » a été aussi évaluée. Le temps « pré-carbo » correspond à l'audiométrie avant le C1 sauf si les données de grade ou l'audiogramme n'étaient pas disponibles. Dans ce cas, le bilan à baseline a été considéré. Le temps « post-carbo » est attribué au bilan auditif avant le C3 s'il y avait un audiogramme. Dans le cas contraire, l'audiométrie après la fin du traitement a été considérée.

L'évaluation de la toxicité auditive a été effectuée selon deux approches : l'une consistant à comparer les paramètres auditifs pré- et post-carbo (i.e., variation) par calcul des différences (post –pré) pour rendre compte de la toxicité du carboplatine haute dose et l'autre consistant à regarder l'état auditif en post-carbo (permettant d'intégrer dans l'analyse des patients n'ayant pas eu les audiogrammes pré-carbo).

II.B.3. Analyses statistiques

Etant donné que les patients évaluables pour l'ototoxicité ont reçu 2 ou 3 cycles de carboplatine et que le degré de l'ototoxicité est connue pour être dépendante de l'AUC cumulée¹⁶⁷, la corrélation entre l'AUC totale reçue et la toxicité auditive a été analysée à l'aide d'un test de Khi-2 pour les variables qualitatives (e.g., grade CTCAE) et de la régression linéaire pour les variables quantitatives (PTA4, m4000-8000,...). Si cette corrélation est démontrée, l'AUC cumulée sera incluse dans les analyses pharmacogénétiques comme une covariable.

L'étude de l'association entre le génotype de chaque SNP et les paramètres auditifs en post-carbo ainsi leur variation pré/post carbo a été réalisée en utilisant le package SNPAssoc du logiciel R. Un test préalable de l'écart à l'équilibre Hardy Weinberg a été effectué avant l'analyse.

II.C. Résultats

II.C.1. Description de l'évaluation auditive

Le nombre de patients évaluable pour les différentes analyses est résumé dans la Figure 16.

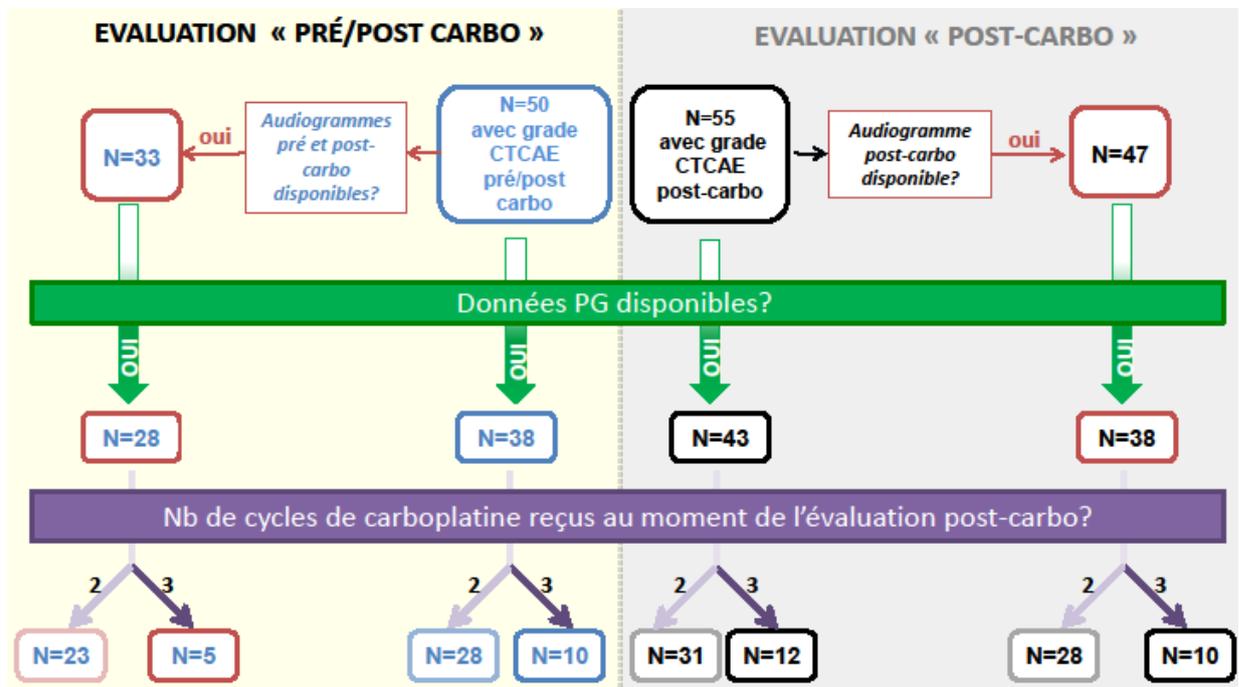


Figure 16. Effectifs de patients pour les différentes analyses. Le nombre de patients varie selon la disponibilité des audiogrammes et des données génétiques (PG).

L'histogramme de la Figure 17 nous donne une vision globale sur l'atteinte auditive induite par le carboplatine. Avant l'administration du carboplatine, aucun patient ne souffre d'atteinte auditive de grades 3 et 4 mais environ 55% des patients ont déjà une atteinte de grade 1 ou 2, probablement liée à un traitement antérieur par cisplatine. Après 2 ou 3 cycles de carboplatine, plus de 50% des patients présentent une atteinte de grades 3 et 4.

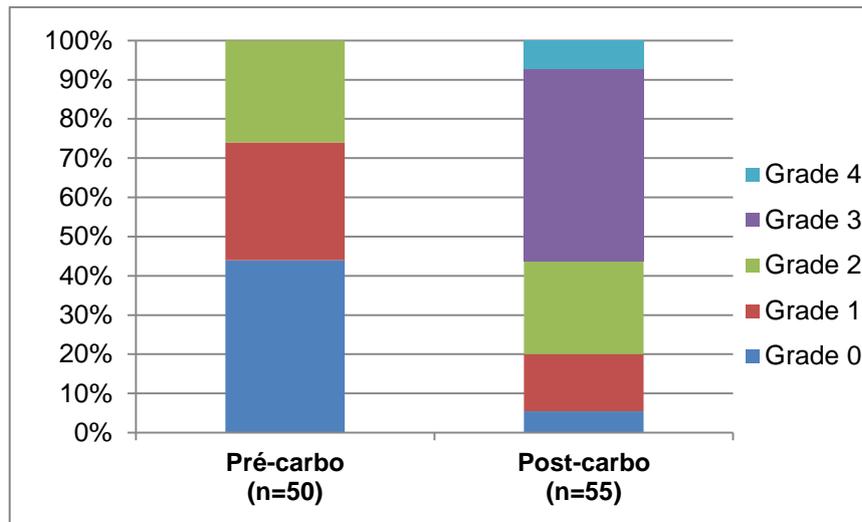


Figure 17. Evaluation de la sévérité de la toxicité auditive induite par le carboplatine haute dose.

La Figure 18 représente le seuil auditif moyen entre les 2 oreilles à chaque fréquence en pré- et en post-carbo. La perte auditive à 4000Hz et 8000Hz déjà présente en pré-carbo est caractéristique d'une chimiotoxicité du cisplatine utilisé précédemment. L'administration du carboplatine haute dose aggrave cette toxicité auditive, comme l'indique l'augmentation du seuil auditif à ces deux fréquences et également l'atteinte des fréquences plus basses.

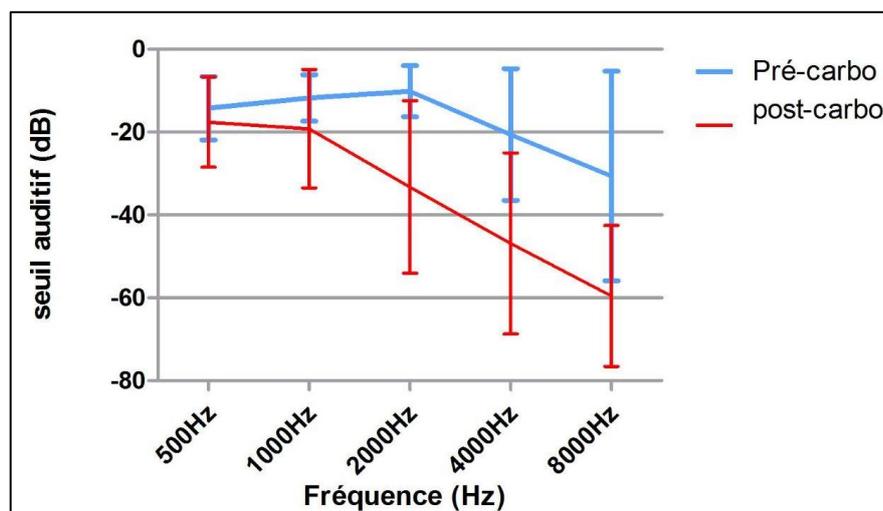


Figure 18. Seuil auditif moyen des 2 oreilles (en dB) aux différentes fréquences en pré- (n=37) et post-carbo (n=47).

Le Tableau 4 montre que l'aggravation de l'atteinte auditive est statistiquement significative : variation significative ($p < 0.01$) du PTA4 moyen et le m4000-8000 moyen des deux oreilles entre le temps pré- et post-carbo. De manière attendue, si seulement l'oreille la plus atteinte est considérée, la variation moyenne pré/post carbo des deux paramètres audiométriques (PTA4 et m4000-8000) est plus importante que la variation moyenne pré/post carbo de leur moyenne des 2 oreilles (-21 vs -17 pour PTA4 ; -35 vs -31 pour m4000-8000).

Tableau 4. Données audiométriques des patients évaluables de l'étude TICE.

	Moyenne (intervalle)	p-value ^b
Evaluation globale		
- PTA4 moyen des 2 oreilles (en dB)		
"pré-carbo" (n=36)	-13 (-1 à -32)	< 0.01
"post-carbo" (n=47)	-28 (-5 à -66)	
- Variation du PTA4 moyen des 2 oreilles (n=33)	-17 (8 à -53)	
- m4000-8000 moyen des 2 oreilles (en dB)		
"pré-carbo" (n=36)	-26 (0 à -70)	< 0.01
"post-carbo" (n=47)	-53 (-5 à -91)	
- Variation du m4000-8000 moyen des 2 oreilles (n=33)	-31 (0 à -61)	
Evaluation unilatérale^a (n=33)		
- Variation du PTA4 (en dB)	-21 (8 à -65)	
- Variation du m4000-8000 (en dB)	-35 (-5 à -63)	

^a L'oreille la plus atteinte a été considérée

^b test de Student pour séries appariées

II.C.2. Analyses statistiques

L'analyse de la corrélation entre l'AUC cumulée a donné un résultat significatif pour la variation pré/post carbo du PTA4 de l'oreille la plus atteinte ($p=0.04$), pour le m4000-8000 moyen des deux oreilles ($p=0.03$) et des résultats à la limite de la significativité (p -value proche de 0.05) pour les autres paramètres. L'étude de l'association entre la génétique et de l'ototoxicité a donc été effectuée en prenant l'AUC cumulée comme une covariable. Les SNPs dont l'association était significative sont présentés dans le Tableau 5 et 6 avec la p -value correspondant ainsi que la répartition des génotypes.

Tableau 5. Association entre les polymorphismes génétiques et la variation pré/post-carbo de différents paramètres auditifs.

Variation du grade CTCAE pré/post carbo (n=38)				
	Variation ≤1	Variation > 1	p-value	
<i>LRP2 rs2075252</i>				
GG	13	6	0.032	
GA et AA	6	13		
<i>COMT rs4646316*</i>				
CC et CT	15	19	0.017	
TT	4	0		
Variation des paramètres audiométriques pré/post carbo (n=28)				
	Moyenne (en dB)	n	p-value	
- PTA4 moyen des 2 oreilles :				
<i>ATP7A rs2227291</i>				
CC	-3	4	0.026	
GG	-20	24		
<i>GSTT1 délétion</i>				
+/+ et +/-	-16	24	0.028	
-/-	-31	4		
- PTA4 de l'oreille la plus atteinte :				
<i>ATP7A rs2227291</i>				
CC	-5	4	0.025	
GG	-25	24		
<i>GSTT1 délétion*</i>				
+/+ et +/-	-20	24	0.045	
-/-	-35	4		
- m4000-8000 de l'oreille la plus atteinte :				
<i>ATP7B rs9526820</i>				
CC	-38	23	0.045	
CT	-23	5		

*Association non significative lorsque l'analyse n'a pas été ajustée par l'AUC cumulée

Tableau 6. Association entre les polymorphismes génétiques et l'état auditif en post-carbo.

Grade CTCAE (n= 43)			
	Grade 0-2	Grade 3-4	p-value
<i>ATP7A rs2227291</i>			
CC	6	1	<i>0.0035</i>
GG	11	25	
m4000-8000 moyen des 2 oreilles (en dB) (n=38)			
	Moyenne	n	p-value
<i>ATP7A rs2227291</i>			
CC	-39	6	<i>0.004</i>
GG	-58	32	
<i>ABCC3 rs4793665</i>			
TT et CT	-59	28	<i>0.030</i>
CC	-45	10	

II.D. Discussion

L'évaluation audiométrique permet de montrer l'implication du carboplatine haute dose dans la toxicité auditive : présence d'une proportion importante des patients atteints de grade 3 et 4 de l'ototoxicité en post-carbo alors qu'en pré-carbo, il n'y avait que des grades 1 et 2 ; aggravation de l'atteinte auditive aux fréquences aiguës et propagation aux fréquences plus basses ; et surtout différence significative des valeurs de variables audiométriques entre pré- et post-carbo. Cependant, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux des autres études TICE car la manière dont l'ototoxicité a été évaluée est souvent mal décrite et les résultats ont été différemment présentés dans chaque étude. En effet, Kondagunta et *al.*¹⁶⁴ ont reporté que parmi les 47 patients qui avaient reçu le traitement, seuls 19 patients ont été évalués pour l'ototoxicité et que l'atteinte auditive était plus sévère aux fréquences supérieures à 4000Hz (i.e., tous les 19 patients ont eu une atteinte modérée ou sévère à ces fréquences) sans préciser les critères sur lesquels a été basée l'évaluation auditive (utilisation de grades non définis). Dubs et *al.*¹⁶⁸ ont reporté l'observation d'une atteinte auditive aux fréquences supérieures à 2000Hz avec des acouphènes chez six des neuf patients ayant reçu le protocole TICE (trois de ces 6 patients ont nécessité le port d'une prothèse auditive). Chez les trois autres patients, l'atteinte auditive était apparente malgré l'absence d'audiogrammes.

Comme discutés en introduction, le nombre de patients inclus (100 patients) dans cet essai TICE et la maîtrise des AUCs de carboplatine constituaient une opportunité d'étudier le rôle de facteurs génétiques sur la survenue de la toxicité auditive. Malheureusement, la collecte des données d'audiogrammes pour cette étude multicentrique a été plus complexe que prévue avec beaucoup de données manquantes et présentant une grande hétérogénéité (avec des audiogrammes réalisés après 2 ou 3 cycles, voire quelques mois après la fin du traitement). Aussi, notre étude pharmacogénétique se veut exploratoire et nécessitera une validation sur une autre cohorte indépendante. L'utilisation des variables quantitatives de l'audiogramme, telles que le PTA4 ou la m4000-8000 semble néanmoins une manière objective d'évaluer cette atteinte auditive.

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec le variant rs2227291 de ATP7A (c.2299G>C ; p.Val767Leu) qui semble associé à la diminution du PTA4 dans l'évaluation pré/post carbo et également sur l'atteinte auditive observée en post-carbo. Ce gène est localisé sur le chromosome X. Ainsi, chez nos patients masculins, les génotypes retrouvés ont

été 2299GG ou 2299CC. Dans notre étude, le génotype GG (sauvage) est associé à une sensibilité plus importante à la toxicité auditive. Aucune étude de fonctionnalité n'a été réalisée sur ce variant mais d'après les outils de prédiction de l'effet du variant PolyPhen et SIFT²¹⁶, ce variant est considéré comme "délétère" et "qui affecte possiblement la protéine". Ainsi, le génotype CC s'accompagnerait d'une activité moindre d'ATP7A. Il n'existe aucune donnée sur les conséquences des variants génétiques vis-à-vis du transport du platine. Cependant, différentes études ont démontré un lien entre une expression élevée d'ATP7A et la résistance au platine, qui s'accompagne pourtant d'une augmentation de l'accumulation de platine dans la cellule^{217,218}. L'hypothèse avancée par les auteurs est qu'en présence d'une forte expression d'ATP7A, le platine est séquestré dans des vésicules, l'empêchant ainsi d'exercer sa cytotoxicité, notamment au niveau de l'ADN du noyau. Concernant le variant c.2299G>C, notre résultat est contraire à celui observé par Li et al.²¹⁹ chez 152 patientes traitées par dérivés de platine pour un cancer ovarien puisque les patientes porteuses de l'allèle C étaient plus sensibles au cisplatine en terme de réponse tumorale. Puisque les mécanismes de résistance au platine et de toxicité auditive résultent d'évènements différents, il est probablement difficile d'établir un parallèle entre ces deux résultats.

Parmi les 4 SNPs testés d'ATP7B, seul le rs9526820 a été significativement associé à la variation du m4000-8000. Là aussi, le génotype sauvage s'accompagne d'une plus forte variation pré/post carbo du paramètre que les patients hétérozygotes CT avec néanmoins une p-value proche de 0,05. Il s'agit d'un variant intronique choisi par la fonction « tagger » de Haploview dont la conséquence sur la protéine ATP7B n'est pas connue. Une étude est actuellement en cours pour déterminer si ce SNP est en « linkage disequilibrium » avec des SNPs d'ATP7B qui auraient des conséquences fonctionnelles connues. De plus, une étude par haplotype, qui tiendrait compte de la combinaison des différents SNPs d'ATP7B, sera également réalisée pour compléter notre étude pharmacogénétique.

L'analyse des SNPs associés au m4000-8000 au temps post-carbo montre que la présence d'un ou deux allèles -211T d'ABCC3 est associé à une valeur plus faible du m4000-8000 synonyme d'une atteinte de l'audition des sons aigus majorée. Le SNP -211C>T est localisé au niveau du promoteur du gène ABCC3 et une étude a montré qu'il s'accompagnait d'une diminution de la quantité d'ARNm au niveau hépatocytaire en présence de l'allèle T, en lien avec la diminution de la liaison de facteurs nucléaires au niveau de la région promotrice du gène²²⁰. Dans l'hypothèse où ABCC3 participerait à l'efflux du platine ou du platine conjugué

au glutathion au niveau des cellules de la cochlée, nos résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de l'accumulation du platine à l'intérieur de la cellule en raison d'une expression moindre d'ABCC3 chez les patients porteurs de l'allèle T. Précédemment, un autre variant d'ABCC3, le rs1051640 (c.4509A>G, E1505E), avait également été associé à la survenue d'ototoxicité chez des enfants traités par cisplatine¹⁸⁰. Cependant cette association n'a pas été retrouvée dans l'étude de Soliman et *al.*²²¹. La fonctionnalité de ce variant (rs1051640) n'étant pas avérée, nous avons choisi un variant d'ABCC3 (celui de notre étude) plus connu avec des données publiées concernant l'impact fonctionnel. Le résultat significatif sur ABCC3 - 211C>T pourrait nous amener à génotyper le variant rs1051640 pour voir s'il est également associé à la valeur du m4000-8000.

La délétion du gène GSTT1 a été associée à l'ototoxicité dans notre étude. Une variation pré/post carbo plus importante du PTA4 a été observée chez les patients pour lesquels les 2 copies du gène sont absentes. Le même résultat a été observé par une autre étude réalisée par Lui et *al.*¹⁹² chez 106 enfants. Cette observation paraît physiologiquement logique puisque GSTT1 a une activité anti-radicalaire et est impliquée dans le phénomène de détoxification. Pourtant, dans l'étude de Talach et *al.*¹⁸² chez 55 adultes et celle de Choeyprasert et *al.*¹⁹⁰ chez 68 enfants recevant le cisplatine, la présence de 2 copies du gène était associée à l'ototoxicité. L'hypothèse de ces auteurs est que les patients cancéreux sont souvent en carence nutritionnelle et ont donc un déficit en glutathion. Chez les patients ayant 2 copies du gène, cette carence pourrait entraîner la redistribution de glutathion vers les tissus ayant une activité métabolique plus importante que le tissu cochléaire et, par conséquent, selon ces auteurs, ces patients présenteraient une toxicité plus importante que ceux n'ayant pas le gène. Cependant, dans une autre étude¹⁹¹ sur une plus grande cohorte (173 patients atteints de cancer de testicule recevant le cisplatine), l'association entre le polymorphisme de GSTT1 et l'atteinte auditive n'était pas significative, mais la susceptibilité à l'ototoxicité était dépendante du polymorphisme d'autres gènes codant pour les autres membres de la famille des GST tels que GSTM1 et surtout GSTP1. Dans cette étude, l'haplotype GSTT1 positif, GSTM1 positif et génotype GG pour GSTP1 a été associé à une moindre toxicité auditive. Par contre, la présence de l'haplotype GSTT1 positif, GSTM1 positif et génotype AA pour GSTP1 a augmenté l'atteinte auditive. Donc, le résultat observé dans notre étude pourrait être un reflet de l'association sous-jacente entre le polymorphisme de ces autres gènes (i.e., GSTM1

et GSTP1) et l'ototoxicité. Ainsi, le génotypage de GSTM1 et GSTP1 pourrait être réalisé sur notre cohorte pour compléter le résultat obtenu avec GSTT1.

Enfin, l'analyse de la toxicité auditive exprimée en catégories de patients classés selon le grade a permis d'inclure quelques patients supplémentaires et a montré que 2 SNPs (COMT rs4646316 et mégaline rs2075252) étaient associés à l'aggravation du grade CTCAE. L'analyse a montré qu'aucun des patients porteurs de 2 allèles T (n=4) du SNP rs4646316 de COMT n'a présenté une variation du grade CTCAE pré/post carbo supérieure à 1, suggérant le rôle protecteur de cet allèle. Ce résultat est en accord avec celui de l'étude réalisée par Ross et *al.*¹⁷² évaluant le rôle des polymorphismes de COMT et TPMT dans l'ototoxicité du cisplatine chez 54 enfants et sur une cohorte de réplication de 112 enfants. Dans cette étude et une autre étude¹⁸² (réalisée chez 55 adultes), l'allèle T de l'autre SNP de COMT (rs9332377) était significativement associé à l'ototoxicité, mais cette association était absente dans notre étude. En 2012, Pussegoda et *al.*¹⁸⁰ ont observé la même tendance que dans la première étude (Ross et *al.*¹⁷²) pour les 2 SNPs de COMT sur une cohorte indépendante de 155 enfants malgré l'absence d'une association significative. De plus, dans la première¹⁷² et la troisième études¹⁸⁰, l'impact des polymorphismes de TPMT (rs12201199, rs1142345 et rs1800460) sur la toxicité auditive du cisplatine a été également mis en évidence, mais aucun de ces SNPs étaient significativement associés aux paramètres auditifs de notre étude. L'absence de relation entre les polymorphismes de TPMT et la toxicité auditive a été aussi démontré par l'équipe du St Jude's Hospital (Memphis, Tennessee, USA) dans une étude réalisée chez 213 enfants traités par cisplatine ainsi que sur des modèles animaux (souris porteuses de différent géotypes TPMT).

L'allèle A du SNP rs2075252 (c.12280A>G ; p.Lys4094Glu) de la mégaline a été associé à une variation du grade CTCAE pré/post carbo supérieure à 1. Dans l'étude menée par Riedemann et *al.*¹⁸³, cet allèle (qui constitue l'allèle mineur) était aussi associé à la perte auditive induite par le cisplatine. Compte tenu de son rôle de récepteur endocytaire et de sa localisation au niveau de la cochlée, la mégaline pourrait être impliquée dans l'entrée du platine à l'intérieur des cellules de la cochlée et responsable donc de l'ototoxicité. Si une hypothèse est faite que l'allèle A était l'allèle fonctionnel du gène et l'allèle G, non fonctionnel, le résultat observé pourrait être simplement expliqué par la diminution de l'accumulation intracellulaire du platine chez les porteurs de l'allèle G due à une moindre activité du

récepteur. Aucune étude de fonctionnalité de ce SNP n'a été réalisée, mais il a été reporté que l'allèle G était associé au syndrome de Donnai Barrow ^{222(p93)}, qui est un syndrome rare et parfois sévère de malformations congénitales multiples associé à une dysmorphie faciale caractéristique, des troubles oculaires, une surdité, une agénésie du corps calleux et un déficit intellectuel variable. Nos résultats relatifs à la mégaline, son polymorphisme et la toxicité auditive du carboplatine encourage aussi l'étude de l'implication de ses polymorphismes dans la toxicité (y compris rénale) des dérivés de platine.

En conclusion, notre étude pharmacogénétique a permis d'identifier des variants associés avec l'aggravation des paramètres auditifs mais la puissance est extrêmement limitée en raison d'un effectif de patients trop limité, qui entraîne notamment la sous-représentation de certains génotypes. On voit également que l'échelle utilisée pour la gradation de cette toxicité peut influencer les résultats (nos résultats significatifs en grade ne le sont pas forcément sur les paramètres quantitatifs de l'audiogramme) et ceci peut expliquer les résultats contradictoires publiés jusqu'ici. L'utilisation des variables brutes de l'audiogramme telles que PTA4 ou m4000-8000 nous paraissent plus objectives. Le résultat le plus intéressant est probablement celui d'ATP7A rs2227291 qui s'accompagne des plus faibles p-values même s'il reste à définir le mécanisme par lequel ce variant influence le transport et/ou la séquestration du platine au niveau des cellules de la cochlée. Il serait intéressant que les équipes ayant déjà réalisé des études pharmacogénétiques de l'ototoxicité puissent génotyper ce variant pour voir s'ils retrouvent une association. Ces analyses feront l'objet d'un manuscrit spécifique.

III. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES ET PHARMACOGENETIQUES DE L'ETOPOSIDE

III.A. Article n° 3

Ce manuscrit est en préparation.

Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Study of Etoposide in High-Dose Protocol (TI-CE) for Advanced Germ Cell Tumors.

Sotheara MOEUNG^{1,2}, Christine CHEVREAU¹, Sophie BROUTIN³, Jérôme GUITTON⁴, Bénédicte LELIEVRE⁵, Joseph CICCOLINI⁶, Christophe MASSART⁷, Aude FLECHON⁸, Rémy DELVA⁹, Gwenaëlle GRAVIS¹⁰, Jean-Pierre LOTZ¹¹, Jacques-Olivier BAY¹², Marine GROSS-GOUPIL¹³, Angelo PACI³, Sabrina MARSILI^{1,2}, Caroline DELMAS^{1,2}, Thierry LAFONT^{1,2}, Etienne CHATELUT^{1,2}, Fabienne THOMAS^{1,2}.

- 1) Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France
- 2) CRCT, Université de Toulouse, Inserm, Toulouse, France
- 3) Institut Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Service de pharmacologie Villejuif, France
- 4) Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Lyon, France
- 5) Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Angers, France
- 6) CHU La Timone, Marseille, France
- 7) Institut Gustave Roussy, Oncologie Médicale, Villejuif, France
- 8) Centre Léon Bérard, Lyon, France
- 9) Institut De Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Angers, France
- 10) Institut Paoli Calmettes, Marseille, France
- 11) Hôpital Tenon, Paris, France
- 12) CHU Clermont Ferrand, France
- 13) Hôpital Saint André, Bordeaux, France

The authors declare no potential conflicts of interest

Keywords. Etoposide, high-dose regimen, pharmacokinetic, pharmacogenetic, germ cell tumors, TI-CE

Running Title: Pharmacokinetic and pharmacogenetic of etoposide in high-dose regimen

Additional information.

The study was funded by a French Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC).

Corresponding author:

Pr Etienne Chatelut

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole

1 avenue Irène Joliot-Curie

31059 Toulouse Cedex 9

chatelut.etienne@iuct-oncopole.fr

Tél : +33 5 31 15 52 50 Fax : +33 5 31 15 55 79

Word count: 3913 words

Total number of figures: 1

Total number of tables: 6

Supplementary methods: 1

Abstract

PURPOSE: Pharmacokinetic (PK) and pharmacogenetic (PG) analyses were performed in order to evaluate if further dose individualization of etoposide would be required for patients receiving high dose (HD) within the TI-CE (taxol, ifosfamide, carboplatin, and etoposide) protocol.

METHODS: Eighty-eight patients were evaluable for PK analysis. Etoposide was administered at a dose of 400 mg/m²/day as a 1-hour IV infusion on 3 consecutive days over 3 cycles as part of a phase II trial evaluating efficacy of therapeutic drug monitoring (TDM) of carboplatin in the TI-CE HD protocol. PK data consisting in 27 concentrations for each patient (3 samples x 3 days x 3 cycles) were simultaneously analyzed using population PK model with NONMEM 7.2 to quantify etoposide PK inter- and intra-individual variabilities. Covariate analysis was subsequently performed to identify the significant covariates on etoposide PK parameters. A relationship between exposure and etoposide pharmacodynamics endpoints was also assessed. PG study was carried out to find an association between genetic polymorphism in 6 different genes and tumor response or toxicity of etoposide.

RESULTS: The inter-patient variability of CL was 16%. The inter-cycle and intra-cycle variabilities were 9% and 0.1%, respectively. Etoposide CL was dependent on the ratio (body weight/serum creatinine), but the variability of exposure was not significantly reduced when dose was calculated using the covariate equation. A trend toward higher etoposide AUC in patients who responded to treatment was observed despite the absence of significant association. A significant correlation was found only between exposure and late neutropenia in cycle 3. The PG study revealed a significant association between UGT1A1*28 polymorphism and late neutropenia but needs further evaluation in a wider population

CONCLUSIONS: The present study suggests that neither *a priori* dose individualization nor dose adaptation using TDM is required for etoposide used in the TI-CE protocol.

INTRODUCTION

Etoposide is considered as an ideal agent for high-dose (HD) protocol due to its wide range of clinical antitumor activity at standard doses, steep dose-response curve, mild bone marrow suppression, and few non-myeloid side effects¹. Since the late 1980s, HD etoposide with autologous bone marrow transplantation has become a component of several HD therapies²⁻⁷ including the TI-CE protocol for advanced germ cell tumors⁸.

Up to the present, the conventional dosing method based on body surface area (BSA) is used to calculate the dose for this drug despite a minimal or no correlation, reported in several studies⁹⁻¹¹, between this covariate and etoposide pharmacokinetic (PK) parameters. Furthermore, a high interindividual PK variability (coefficient of variation between 25% and 32% for etoposide clearance) has been observed with etoposide administered at regular doses¹²⁻¹⁴. A number of studies have therefore attempted to define *a priori* dosage adjustments based on renal function^{13,15} or to further perform a PK-guided therapeutic drug monitoring (TDM)¹⁶ as a means of individualizing etoposide doses in those standard-dose regimens.

The TI-CE protocol is the combination of 2 cycles of paclitaxel (T) and ifosfamide (I) followed by 3 cycles of HD carboplatin (C) and etoposide (E). In this HD protocol, etoposide is given at the dose of 400 mg/m²/day during 3 consecutive days. We have recently demonstrated, in a phase II trial, that Bayesian-based TDM of carboplatin in this protocol allowed an accurate control of inter-patient variability of its exposure¹⁷. In the setting of any high-dose chemotherapy, a good control of the exposure to anticancer drug is required to avoid unacceptable toxicity or underexposure of patients, which may hamper treatment benefit.

Therefore, the objective of this ancillary pharmacokinetic study within the phase II TI-CE trial was to quantify the etoposide PK inter- and intra-individual variability in order to evaluate if further dose individualization (*a priori* method or PK-guided TDM) of this drug would be required for this HD protocol. Furthermore, association between genetic variation of certain genes and treatment response or toxicity of etoposide was also investigated.

PATIENTS AND METHODS

Patients and treatment

Eighty-nine patients received etoposide as part of a phase II, multicenter trial (8 centers in France) evaluating efficacy of TDM of carboplatin in advanced germ cell tumor patients receiving the TI-CE HD protocol (ClinicalTrials.gov reference number NCT00864318). However, only eighty-eight patients were evaluable for the present analysis due to

unavailable etoposide concentration data in one patient. The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1. Among those 88 patients, 17 did not undergo the 3 planned cycles (i.e., they received only one or two cycles) because of unacceptable toxicity (6 patients), tumor progression (4 patients), death (3 patients) or other causes (4 patients).

Etoposide administration, blood sampling, drug assay

Etoposide was given in combination with carboplatin during the dose intensification phase at the dose of 400 mg/m²/day for 3 consecutive days over 3 cycles with peripheral blood stem cell (PBSC) support. On each day, etoposide was administered as a 1-hour IV infusion in 1 L of saline solution immediately after the end of carboplatin infusion. In one center (Marseille), the duration of the infusion was set at 4 hours according to a protocol specific to this site (10 patients). For each administration, three blood samples were collected before the start of infusion of etoposide, at the end of the infusion and at 3 hours after the end of infusion. These three sampling times correspond to the samples taken for the carboplatin PK analysis¹⁷ in order to avoid multiple blood sampling in patients. All the plasma samples were sent to Institut Claudius-Regaud laboratory to be assayed.

Plasma levels of etoposide were measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using teniposide as the internal standard after organic extraction according to a previously reported method¹⁸ with ultraviolet detection at 229 nm. Intra- and inter-assay coefficients of variation were lower than 20%.

Genotyping

Patient genomic DNA was extracted from the whole blood samples according to the instructions of the EZ1 DNA blood kit and the EZ1 Advanced instrument (Qiagen, Chatsworth, CA). A total of 11 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) and genetic variations of 6 different genes involved in the transmembrane transport and metabolism of etoposide were studied (Table 2). Genotyping of the patients was carried out by Taqman real-time PCR assay, sequencing or melting curve-based allele-specific PCR method.

Taqman real-time PCR assay was performed according to manufacturer instructions (ThermoFischer). For UGT1A1 and ABCB1, regions of interest were amplified by PCR with Hotstart Taq Master mix (Qiagen) as described by the manufacturer and sequenced for SNP genotyping. A M13 primer sequence was incorporated at the 5' end of all PCR primers (shown in Table 2) to facilitate subsequent DNA sequencing. PCR products were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)

with forward or reverse M13 primers. Products were analyzed using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The presence of CYP3A5*1/CYP3A5*3 alleles was determined on genomic DNA with allele specific real time PCR as previously described by Yates and colleagues¹⁹.

Pharmacokinetic analysis

✓ *Determination of individual clearance and AUC*

Our previous study has shown the benefit of population pharmacokinetic (Pop-PK) and Bayesian estimation in determining individual PK parameter values of etoposide using a limited number of plasma samples²⁰.

In the present study, the pharmacokinetic analysis was performed using non-linear mixed-effect modeling and Bayesian estimation on NONMEM software program (Version 7.2) to obtain individual PK parameters. Etoposide concentration-time data of all the patients on each day and each cycle of the treatment (3 concentrations x 3 days x 3 cycles) were simultaneously analyzed using a two compartment PK model. The interindividual and the residual variability were assessed with log-normal model and proportional model respectively. The intra-patient variability of clearance (both intra- and inter-cycle variability) was evaluated using inter-occasion variability (IOV) model (supplementary methods 1), and the first order conditional with interaction (FOCE-I) method was the estimation method.

Individual values of actual clearance (CL) were obtained from the model as empirical Bayes estimates for each day of the 3 cycles of treatment. Daily actual AUC were then determined by dividing each daily etoposide dose by the corresponding actual CL value. The total actual AUC per cycle were obtained by the sum of the 3 daily actual AUCs of the same cycle.

✓ *Covariate analysis*

Demographic and biological characteristics of each patient were considered as covariates to be tested to estimate their impact on PK parameters : age (in years), body weight (BW in kg), body surface area (BSA in m²), serum creatinine (Scr in μM), serum cystatin C (CysC in mg/L), aspartate transaminase (ASAT in UI/L), alanine transaminase (ALAT in UI/L), alkaline phosphatase (ALP in UI/L), total bilirubin (BILI in μM), lactate dehydrogenase (LDH in UI/L), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT in UI/L), total protein (PROT in g/L), albumin (ALBU in g/L) as well as the patients' genotypes for the 11 selected SNPs.

The influence of the covariates (including genotypes) was separately evaluated on CL. Based on our previous work¹³, the ratio BW/Scr was also tested. The influence of PROT and ALB was examined on central (V₁) and peripheral (V₂) volumes. Covariate analysis was carried out using allometric equation as follows:

$$\text{TVP} = \theta_1 \times (\text{quantitative covariate}/\text{mean covariate})^{\theta_2}$$

or $\text{TVP} = \theta_1 \times (\theta_2)^{\text{dichotomous covariate}}$

where θ_1 is the typical value of the parameter (TVP) for a patient with the mean covariate value and θ_2 , the estimated influential factor for the covariate in the case of quantitative covariate. For dichotomous covariate, θ_1 is the TVP for patients in the first category, and θ_2 is the relative fraction between TVP of patients in the second category and that in the first category. Dichotomous covariate can take either the value “1” or “0”. In the case of genetic data, heterozygote patients were grouped with either those with homozygous mutant or homozygous wild-type genotype to form 2 categories.

Patients having missing baseline value for at least one covariate were excluded from the covariate analysis. Consequently, a dataset of only 74 patients was available for the covariate testing, and each patient of the dataset had different covariate values for each cycle of treatment except for genetic data. A covariate is considered having a significant relationship with a PK parameter if its inclusion in the model is associated with a decrease of the objective function value (OFV) of at least 3.84 (khi-2 test of difference with $p < 0.05$, one degree of freedom). The OFV is equal to minus twice the log likelihood of the data. This value is an indicator of the goodness-of-fit of the model. All the significant covariates were then included in an intermediate model. Afterwards, a stepwise backward elimination procedure was performed to keep in the model only covariates associated with an increase in OFV larger than 6.6 ($p < 0.01$, one degree of freedom).

✓ *Evaluation of dose individualization based on the final covariate equation*

Retrospective evaluation of the final covariate equation was performed by calculating the total predicted dose per cycle (D_{pred}) for each patient using the clearance predicted (CL_{pred}) by the equation and the mean total actual AUC per cycle (considered as the “target AUC”): $D_{\text{pred}} = CL_{\text{pred}} \times \text{mean actual AUC}$. For each cycle, the total AUC that each patient would have had using the CL_{pred} was then calculated by the following equation:

$$\text{AUC}_{\text{pred}} = (D_{\text{pred}}/3) \times \left(\frac{1}{\text{actual CL day 1}} + \frac{1}{\text{actual CL day 2}} + \frac{1}{\text{actual CL day 3}} \right)$$

✓ *Pharmacokinetic—pharmacodynamic relationship*

Correlation between etoposide exposure and treatment response or toxicity was evaluated using STATA software program. For the response evaluation, patients with complete response (CR) were considered as responders whereas patients with partial response, stable or progressive disease were classified as non-responders. Exposure's effect on tumor response was assessed by comparing the mean cycle-1 actual AUC or mean cumulative actual AUC between the responder and non-responder groups using student's t-test. The association between etoposide cumulative AUC and overall survival (OS) or progression-free survival (PSF) was evaluated using the Cox proportional hazards model.

Hematological toxicity is very common after carboplatin + etoposide intensification cycles but should be overcome at day 14. It was then decided to focus on persisting neutropenia and thrombopenia using the first available value of absolute neutrophil and platelet count between day 14 and day 21 after treatment (given on days 1, 2 and 3). These late hematological toxicity was graded according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE). To evaluate the relationship between etoposide exposure and the presence of a late hematologic toxicity, at each cycle, mean actual AUC per cycle were compared between the patient groups having grade 0-2 late neutropenia or thrombopenia and those having grade 3-4 late neutropenia or thrombopenia respectively using student's t-test.

Pharmacogenetic analysis

Pharmacogenetic analysis was performed using SNPAssoc package on R software program. Deviation of the genotype frequencies from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium was assessed before any association study was carried out. The association between SNP genotypes and tumor response or cycle-1 late hematotoxicity was analyzed with the statistical significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

Pharmacokinetic analysis

✓ Determination of individual clearance and AUC

The two-compartment PK model describes the data accurately as shown by the IWRES vs. PRED graph (Figure 1) and by the relatively small residual variability (20.2%). The interindividual variability of CL was around 16% and the inter-cycle variability was around 9%. The intra-cycle variability for each cycle was very low (0.1%), so it was fixed at 0. All the model parameters are presented in Table 3.

The mean actual CL (range) values were 31.2 mL/min (17.6 – 43.8), 31.0 mL/min (19.8 – 44.4) and 30.3 mL/min (22.0 – 43.2) for cycle 1, cycle 2 and cycle 3 respectively. The mean total actual AUC values per cycle are given in Table 4.

✓ *Covariate analysis*

During the separate evaluation of each covariate, those having significant influence on CL were BSA, BW, Scr, CysC, ALB, PROT, BILI and the ratio BW/Scr. The decrease of OFV upon the inclusion of each significant covariate and their influential factor (θ_2 value) is shown in Table 5. Genetic polymorphism of the 11 SNPs were not found to influence CL, and no covariates were significant on V_1 and V_2 .

The ratio BW/Scr allows a decrease in OFV greater than the sum of the decreases associated with BW and Scr evaluated separately. Consequently, the ratio BW/Scr was instead included in the intermediate model with the other significant covariates on CL to perform the backward elimination. The significant covariates resulted from this procedure were the ratio BW/Scr and BILI with the equation (\pm 95% confidence interval) :

$$\text{CL (mL/min)} = 31.0 (\pm 1.2) \times [(\text{BW/Scr})/1.0]^{0.229(\pm 0.097)} \times (\text{BILI}/7)^{-0.054 (\pm 0.034)}$$

Due to the limited influential factor associated with BILI (i.e., the power is close to zero) and the negligible decrease of interindividual variability of CL when BILI was added to the ratio BW/Scr (from 13.6% to 13.3%), we decided not to retain this covariate. The model containing only the ratio BW/Scr was then re-evaluated on the whole dataset (88 patients) to obtain the final equation as follows:

$$\text{CL (mL/min)} = 30.8 (\pm 1.1) \times [(\text{BW/Scr})/1.0]^{0.202(\pm 0.093)}$$

✓ *Evaluation of dose individualization using covariates equation*

The variation (expressed in terms of percentage of coefficient of variation) of the total AUC per cycle obtained from the retrospectively-calculated dose using the CL predicted by the final covariate equation is shown in Table 4.

✓ *Pharmacokinetic—pharmacodynamic relationship*

Statistical comparison of mean actual AUC (cycle-1 and cumulative AUC) between responder and non-responder groups is shown in Table 6. A trend toward higher exposure was observed in patients experiencing clinical response but the difference between the responder and non-responder groups was not significant ($p=0.05$). No

association has been found between etoposide cumulative AUC and the OS or the PFS ($p=0.78$ and 0.29 respectively).

For hematologic toxicity, only the mean actual AUC of cycle 3 was found to be significantly ($p=0.01$) higher in the patients having grade 3-4 neutropenia than those having grade 0-2 neutropenia as shown in Table 6.

Pharmacogenetic analysis

Genotype data were available for only 78 patients. No deviation of the genotype frequencies from those expected under Hardy–Weinberg equilibrium was observed. There was no significant association between polymorphism of each SNP with the response to treatment.

For hematotoxicity, a significantly ($p=0.02$) higher proportion of patients with grade 3-4 neutropenia was observed among the patients carrying homozygous mutant genotype for UGT1A1 (i.e., having two UGT1A1*28 alleles) compared to heterozygous and wild-type patients (86% *versus* 40%) as shown in Table 6.

DISCUSSION

Etoposide plasma concentration data were adequately described by the two-compartment PK model with the value of the residual variability limited to assay error. The population values of the PK parameters obtained from the model are similar to those reported in the literature for standard-dose protocol^{12,16,20}. However, the inter-patient variability of CL (16%) was lower than that observed in other previous studies. This could be explained by the characteristics of the patients treated with this protocol: young adult males having relatively good organ (renal and hepatic) function. This led to a limited interindividual variability of etoposide exposure as shown in Table 4.

Etoposide is known to be eliminated by renal route and hepatic metabolism. The result of our covariate analysis showed that the final significant covariates on CL were the ratio BW/Scr and, with limited impact, BILI. Indeed in other previous studies^{13,15,21–23}, a significant correlation was found between etoposide CL and serum creatinine level or creatinine clearance, but no or weak correlations were found with regard to covariates which are indicators of liver function (i.e., ALBU, PROT, BILI and liver enzymes). With respect to BILI, Stewart and colleagues²² explained the absence of its significant impact on etoposide CL in patients with liver impairment by the alteration of etoposide protein binding due to bilirubin displacement. They observed, in patients with increased bilirubin, an increase in the unbound fraction (f_u) and a concomitant decrease in clearance of unbound etoposide. They then mathematically deduced that this phenomenon resulted in the absence of significant change in etoposide total systemic clearance observed in

those patients. This and the relatively young patient population in our study could explain the minimal influence of BILI on CL which justified our decision to retain only the ratio BW/Scr in the final covariate equation. Nevertheless, the retrospective dose calculation using CL predicted from the final equation did not lead to a significant reduction of the AUC dispersion, indicating that the dose calculation method based on body surface area is warranted for patients treated with this protocol.

The relationship between etoposide AUC and response was not significant suggesting that efficacy is dependent on other factors than etoposide PK. However, it is interesting to note that the mean actual AUC (either the cycle-1 AUC or the cumulative AUC) was higher in the responder group than in the non-responder group despite a limited variability of etoposide exposure in this study. It can be concluded that etoposide exposure could be, among others, a contributive factor to efficacy of this etoposide/carboplatin regimen. Regarding hematologic toxicity in cycle 3, the mean actual AUC of etoposide was significantly higher in the patient group having grade 3-4 neutropenia than in the group having grade 0-2 neutropenia ($p=0.01$). However, with the absence of significant difference of mean AUC between the 2 groups in the first 2 cycles, this result is not strong enough to support a relationship between AUC of etoposide and neutropenia and to encourage dose adaptation based on TDM. No correlation was found either between observed AUC and the degree of thrombocytopenia in each cycle of treatment. One possible explanation is that the AUC used in our study corresponds to the total plasma etoposide, and it has been reported that exposure to unbound etoposide was found to correlate better with drug effect or hematologic toxicity than total plasma etoposide²⁴.

For certain drugs, the differences between patients in terms of response to treatment or toxicity can be attributed to genetic variations. The pharmacogenetic analysis in the present study showed that there is no association between the genetic polymorphism of the genes involved in etoposide pathway and the treatment response. However, for hematologic toxicity, UGT1A1*28 homozygous genotype was significantly associated with neutropenia. UGT1A1 (UDP-glucuronosyl-transferase family 1 member A1) is a hepatic enzyme of the phase II metabolism which catalyses the glucuronidation of various endogenous and exogenous compounds including etoposide²⁵. UGT1A1*28 allele is characterized by the presence of an additional TA repeat in the TATA sequence of the UGT1A1 promoter [(TA)7TAA instead of (TA)6TAA] which leads to a decreased transcriptional activity of the enzyme²⁶. Theoretically, the observed association can be explained by the accumulation of plasma etoposide due to the reduced elimination (i.e., decreased etoposide CL) in the homozygous mutant patients as reported for other neutropenia-inducing drugs or drug metabolites which are substrates of UGT1A1^{27,28}. However, the influence of UGT1A1 on etoposide CL in our study was not significant when evaluated during the covariate analysis on NONMEM. Likewise, among the patients gradable for late neutropenia and having genotype data for UGT1A1 ($n=64$), there was no

significant difference between the mean actual CL of patients carrying 2 *28 alleles and those carrying 1 or 0 *28 alleles (32.1 mL/min vs. 31.4 mL/min respectively, $p=0.85$). As explained earlier, this could be due to the interaction between etoposide and plasma bilirubin with regard to protein binding in the presence of the decreased activity of UGT1A1. Indeed, among those patients gradable for neutropenia in our study, the median total bilirubin was higher in the homozygous mutant patients (11.1 μM ranging from 8 to 46 μM) than in those with heterozygous and homozygous wild-type genotypes (5.7 μM ranging from 1 to 28.5 μM). The reduced activity of the enzyme in homozygous mutant patients might result in the increase in total bilirubin (as bilirubin is one of UGT1A1's endogenous substrate) and the reduction of unbound etoposide clearance (or intrinsic clearance), which would then lead to the increase of etoposide f_u or unbound concentration without apparent decrease of total systemic CL. As unbound etoposide is the active form of the drug, such an increase would then be accompanied by the observed increase in hematologic toxicity. Nevertheless, the present pharmacogenetic study serves only as an exploratory analysis, and the result needs to be confirmed using a wider population.

CONCLUSION

Despite the observed trend toward higher etoposide AUC in patients who responded to treatment, the association between AUC and response is not strong enough for us to recommend a target etoposide AUC for this protocol. So, neither *a priori* dose individualization based on clearance predicted from covariate equation nor dose adaptation using therapeutic drug monitoring is suggested for etoposide used in the TI-CE protocol. Therefore, dose calculation according to body surface area remains valid for patients treated with this regimen.

REFERENCES

1. Herzig RH. High-dose etoposide and marrow transplantation. *Cancer*. 1991;67(1 Suppl):292-298.
2. Birsan R, Willems L, Pallud J, et al. Efficacy and safety of high-dose etoposide cytarabine as consolidation following rituximab methotrexate temozolomide induction in newly diagnosed primary central nervous system lymphoma in immunocompetent patients. *Haematologica*. 2018;103(7):e296-e299.
3. Fleming DR, Wolff SN, Fay JW, et al. Protracted results of dose-intensive therapy using cyclophosphamide, carmustine, and continuous infusion etoposide with autologous stem cell support in patients with relapse or refractory Hodgkin's disease: a phase II study from the North American Marrow Transplant Group. *Leuk Lymphoma*. 1999;35(1-2):91-98.

4. Long GD, Chao NJ, Hu WW, Negrin RS, Wong RM, Blume KG. High dose etoposide-based myeloablative therapy followed by autologous blood progenitor cell rescue in the treatment of multiple myeloma. *Cancer*. 1996;78(12):2502-2509.
5. Brown RA, Wolff SN, Fay JW, et al. High-dose etoposide, cyclophosphamide, and total body irradiation with allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute myeloid leukemia in untreated first relapse: a study by the North American Marrow Transplant Group. *Blood*. 1995;85(5):1391-1395.
6. Horning SJ, Negrin RS, Chao JC, Long GD, Hoppe RT, Blume KG. Fractionated total-body irradiation, etoposide, and cyclophosphamide plus autografting in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1994;12(12):2552-2558.
7. Phillips GL, Wolff SN, Herzig RH, et al. Treatment of progressive Hodgkin's disease with intensive chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Blood*. 1989;73(8):2086-2092.
8. Motzer RJ, Mazumdar M, Sheinfeld J, et al. Sequential dose-intensive paclitaxel, ifosfamide, carboplatin, and etoposide salvage therapy for germ cell tumor patients. *J Clin Oncol*. 2000;18(6):1173-1180.
9. Ratain MJ, Mick R, Schilsky RL, Vogelzang NJ, Berezin F. Pharmacologically based dosing of etoposide: a means of safely increasing dose intensity. *J Clin Oncol*. 1991;9(8):1480-1486.
10. Miller AA, Tolley EA, Niell HB, Stewart CF, Griffin JP. Pharmacodynamics of three daily infusions of etoposide in patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;31(2):161-166.
11. Minami H, Ando Y, Sakai S, Shimokata K. Clinical and pharmacologic analysis of hyperfractionated daily oral etoposide. *J Clin Oncol*. 1995;13(1):191-199.
12. Toffoli G, Corona G, Sorio R, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(5):511-519.
13. Nguyen L, Chatelut E, Chevreau C, et al. Population pharmacokinetics of total and unbound etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;41(2):125-132.
14. Hande K, Messenger M, Wagner J, Krozely M, Kaul S. Inter- and inpatient variability in etoposide kinetics with oral and intravenous drug administration. *Clin Cancer Res*. 1999;5(10):2742-2747.
15. Joel SP, Shah R, Clark PI, Slevin ML. Predicting etoposide toxicity: relationship to organ function and protein binding. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):257-267.
16. Ciccolini J, Monjanel-Mouterde S, Bun S-S, et al. Population pharmacokinetics of etoposide: application to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2002;24(6):709-714.

17. Moeung S, Chevreau C, Broutin S, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Carboplatin in High-Dose Protocol (TI-CE) for Advanced Germ Cell Tumors: Pharmacokinetic Results of a Phase II Multicenter Study. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7171-7179.
18. Canal P, Michel C, Bugat R, Soula G, Carton M. Quantification of teniposide in human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1986;375(2):451-456.
19. Yates CR, Zhang W, Song P, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol.* 2003;43(6):555-564.
20. Tranchand B, Amsellem C, Chatelut E, et al. A limited-sampling strategy for estimation of etoposide pharmacokinetics in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43(4):316-322.
21. Arbuck SG, Douglass HO, Crom WR, et al. Etoposide pharmacokinetics in patients with normal and abnormal organ function. *J Clin Oncol.* 1986;4(11):1690-1695.
22. Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, Evans WE. Changes in the clearance of total and unbound etoposide in patients with liver dysfunction. *J Clin Oncol.* 1990;8(11):1874-1879.
23. D'Incalci M, Rossi C, Zucchetti M, et al. Pharmacokinetics of etoposide in patients with abnormal renal and hepatic function. *Cancer Res.* 1986;46(5):2566-2571.
24. Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, Evans WE. Relation of systemic exposure to unbound etoposide and hematologic toxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;50(4):385-393.
25. Wen Z, Tallman MN, Ali SY, Smith PC. UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the principal enzyme responsible for etoposide glucuronidation in human liver and intestinal microsomes: structural characterization of phenolic and alcoholic glucuronides of etoposide and estimation of enzyme kinetics. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(3):371-380.
26. Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: Gene-environment interactions. *Hum Genomics.* 2010;4(4):238-249.
27. Minami H, Sai K, Saeki M, et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(7):497-504.
28. Goey AKL, Sissung TM, Peer CJ, et al. Effects of UGT1A1 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicities of belinostat administered by 48-hour continuous infusion in patients with cancer. *J Clin Pharmacol.* 2016;56(4):461-473.

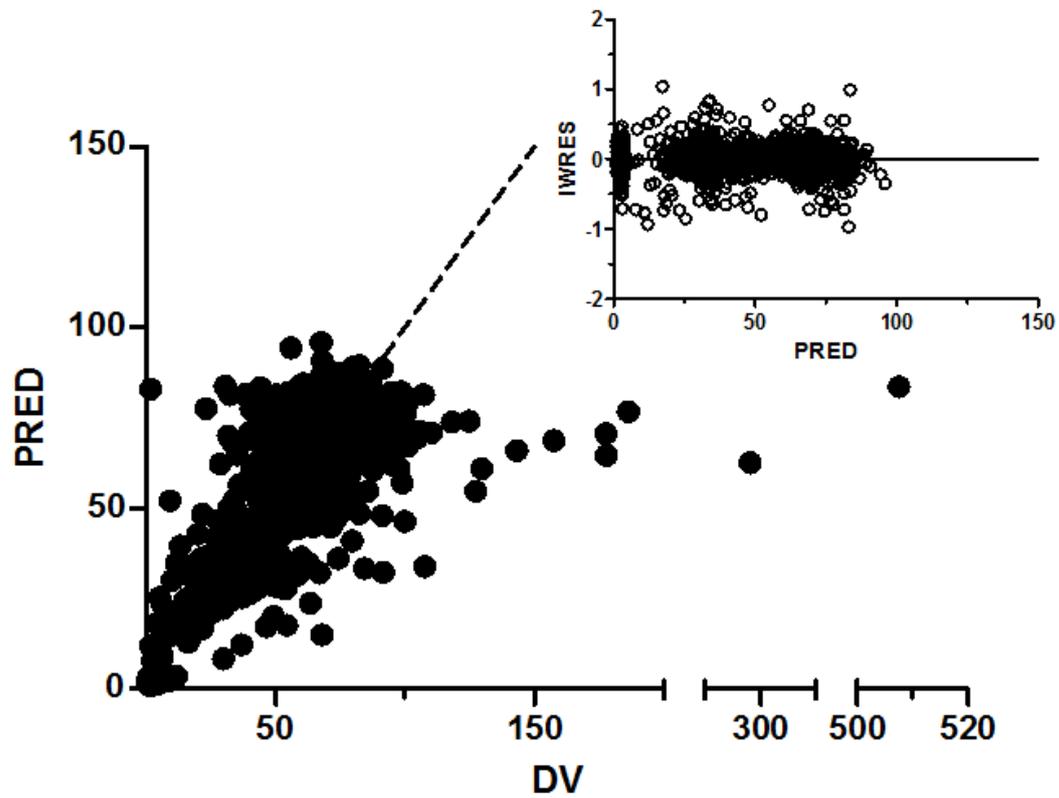


Figure 1. Diagnostic plots of etoposide population pharmacokinetic model (without covariates) representing predicted concentration (PRED) vs. observed concentration (DV). Insert: Individual weighted residual vs. predicted concentration.

Table 1. Baseline covariate values of all the patients and of the patients used for covariate analysis

Covariates	All patients		Patients for covariate analysis*	
	Mean (range)	n	Mean (range)	n
Age (years)	35 (20 - 56)	88	35 (20 - 56)	74
Body weight (kg)	75 (45 - 150)	88	76 (49 - 150)	74
Body surface area (m ²)	1.9 (1.5 - 2.9)	88	1.9 (1.5 - 2.9)	74
Serum creatinine (μM)	81 (46 - 180)	88	83 (46 - 180)	74
Ratio Body weight/Serum creatinine	1 (0.4 - 2.0)	88	1 (0.4 - 2.0)	74
Serum cystatin C (mg/L)	0.9 (0.5 - 1.6)	86	0.9 (0.5 - 1.6)	74
Aspartate transaminase (UI/L)	25 (6 - 155)	80	24 (6 - 155)	74
Alanine transaminase (UI/L)	38 (6 - 143)	80	38 (6 - 143)	74
Alkaline phosphatase (UI/L)	97 (40 - 282)	80	98 (40 - 282)	74
Total bilirubin (μM)	7 (1 - 46)	80	7 (1 - 29)	74
Lactate dehydrogenase (UI/L)	276 (103 - 1241)	79	271 (103 - 1241)	74
Gamma-glutamyl transpeptidase (UI/L)	60 (11 - 240)	80	61 (11 - 240)	74
Total protein (g/L)	65 (53- 76)	80	65 (53 - 76)	74
Albumin (g/L)	37 (23 - 60)	79	37 (23 - 46)	74

* Patients having at least one missing baseline covariate value were excluded from covariate analysis.

Table 2. Genetic polymorphisms selected for pharmacogenetic analysis with corresponding genotyping methods

Gene	Polymorphism	Genotyping method	Taqman assay or primers
NR1I2 (PXR)	rs10934498	Taqman	C__1834252_10
	rs2472677	Taqman	C_26079845_10
	rs1523130	Taqman	C__9152783_20
	rs1523127	Taqman	C____263841_20
	rs3814055	Taqman	C_27504984_30
CYP3A4	rs35599367	Taqman	C_59013445_10
CYP3A5	rs776746	Melt curve analysis	In Yates et al., 2003
UGT1A1	rs8175347	Sequencing	Forward:5'-GCCAGTTCAACTGTTGTTGCC-3' Reverse:5'-CCACTGGGATCAACAGTATCT-3'
ABCB1 (P-gp)	rs1045642	Sequencing	Forward:5'-TTCAGCTGCTTGATGGCAAA-3' Reverse:5'-AGGCAGTGACTCGATGAAGG-3'
	rs2032582	Sequencing	Forward:5'-CAGGCTTGCTGTAATTACCC-3' Reverse:5'-TAGTTTGACTCACCTTCCCA-3'
ABCC3	rs4793665	Taqman	C_27829307_10

NR1I2 (PXR): nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 (Pregnane X Receptor)

CYP3A4: cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4

CYP3A5: cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5

UGT1A1: UDP-glucuronosyltransferase family 1 member A1

ABCB1 (P-gp): ATP binding cassette subfamily B member 1 (P-glycoprotein)

ABCC3: ATP binding cassette subfamily C member 3

Table 3. Parameter values of the model for the analysis of etoposide concentration data

PK parameter	Typical value [%RSE]	Variability (%CV)
		<i>Interindividual variability</i>
CL (L/h)	1.8 [1.9]	15.9
V1 (L)	5.2 [20.7]	46.0
Q (L/h)	9.1 [34.0]	58.0
V2 (L)	7.2 [16.0]	28.1
<i>Inter-cycle variability of CL</i>		9.1
<i>Residual variability</i>		20.2

%RSE : percentage relative standard error

%CV : percentage coefficient of variation

Table 4. Variation of the observed AUC and the AUC obtained if dose were calculated using the final covariate equation

	Mean (mg.min/mL)	CV (%)	n
Actual AUC			
C1	74.3	20.6	88
C2	73.9	17.4	78
C3	74.9	16.4	71
Calculated AUC using CL predicted by covariate equation			
C1	74.7	18.4	88
C2	73.7	16.1	78
C3	76.0	15.0	71

CV : coefficient of variation

Table 5. Covariates having significant influence on etoposide clearance

Covariates	θ_2	OFV	Δ OFV	<i>p</i> value
No covariates		6511.0		
BW	0.262	6503.7	-7.3	P<0.01
Scr	-0.174	6500.7	-10.3	P<0.005
BW/Scr	0.224	6490.9	-20.1	P<0.001
CysC	-0.124	6506.6	-4.4	P<0.05
BSA	0.424	6506.0	-5.0	P<0.05
PROT	-0.222	6505.0	-6.0	P<0.02
ALB	-0.235	6504.7	-6.3	P<0.02
BILI	-0.052	6504.4	-6.6	P<0.01

OFV : Objective Function Value

Table 6. Correlation between AUC (in mg.min/mL) and treatment response or hematologic toxicity and impact of UGT1A1 polymorphism on hematotoxicity

Treatment response	n	Mean AUC C1	Mean cumulative AUC
Responders	35	77.7	223.7
Non-responders	43	71.1	205.1
<i>p-value</i>		0.05	0.06

Hematologic toxicity	Mean AUC C1 (n)	Mean AUC C2 (n)	Mean AUC C3 (n)	UGT1A1 (n)
Grade 0-2 neutropenia	74.7 (41)	73.7 (37)	72.2 (38)	*1/*1 & *1/*28 *28/*28
Grade 3-4 neutropenia	73.3 (35)	73.4 (31)	81.1 (19)	34 1
<i>p-value</i>	0.69	0.90	0.01	23 6
				0.02
Grade 0-2 thrombopenia	73.8 (10)	70.9 (8)	76.7 (6)	
Grade 3-4 thrombopenia	75.2 (63)	74.8 (61)	75.2 (50)	
<i>p-value</i>	0.80	0.43	0.78	

C1, C2, C3 : Cycle 1, Cycle 2, Cycle 3

Supplementary methods 1: NONMEM code for etoposide population PK model

```
$PROB etoposide IOV model
$INPUT ETU ID CYCL=DROP DAY DAT1=DROP TIME DV AMT RATE EVID MDV
$DATA wholedata.prn IGNORE='C'
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4

$PK
OCC1=0
OCC2=0
OCC3=0
OCC4=0
OCC5=0
OCC6=0
OCC7=0
OCC8=0
OCC9=0

IF(DAY.EQ.1) OCC1=1
IF(DAY.EQ.2) OCC2=1
IF(DAY.EQ.3) OCC3=1

IF(DAY.EQ.22) OCC4=1
IF(DAY.EQ.23) OCC5=1
IF(DAY.EQ.24) OCC6=1

IF(DAY.EQ.43) OCC7=1
IF(DAY.EQ.44) OCC8=1
IF(DAY.EQ.45) OCC9=1

TVCL=THETA(1)
A=ETA(1)
B=ETA(2)*OCC1+ETA(3)*OCC2+ETA(4)*OCC3
C=ETA(5)*OCC4+ETA(6)*OCC5+ETA(7)*OCC6
X=ETA(8)*OCC7+ETA(9)*OCC8+ETA(10)*OCC9
Z=ETA(11)*(OCC1+OCC2+OCC3)+ETA(12)*(OCC4+OCC5+OCC6)+ETA(13)*(OCC7+OCC8+OCC9)

CL=TVCL*EXP(A+B+C+X+Z)

TVV1=THETA(2)
V1=TVV1*EXP(ETA(14))

TVQ=THETA(3)
Q=TVQ*EXP(ETA(15))

TVV2=THETA(4)
V2=TVV2*EXP(ETA(16))

S1=V1
AUC=AMT/CL
```

\$THETA (0,4,) ; CL
\$THETA (0,8,) ; V1
\$THETA (0,5,) ; Q
\$THETA (0,8) ; V2

\$OMEGA 0.1 ;iiv CL
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIXED ;IOVCL intracycle 1
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIXED ;IOVCL intracycle C2
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIXED ;IOVCL intracycle C3
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) 0.1 ;IOVCL intercycle
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA BLOCK(1) SAME
\$OMEGA 0.1 ;iiv V1
\$OMEGA 0.1 ;iiv Q
\$OMEGA 0.1 ;iiv V2

\$ERROR
DEL=0
IF(F.EQ.0) DEL=1
W=F+DEL
Y=F+W*EPS(1)
IPRED=F
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

\$SIGMA
0.04 ;rv

\$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION NOABORT SIGDIGITS=3

\$COVARIANCE PRINT=E

\$STABLE ID DAY TIME DV IPRED PRED IWRES WRES CWRES CL AUC AMT MDV EVID ETU
NOPRINT ONEHEADER FILE=IOV_CL.TAB

III.B. Discussion

Comme le carboplatine, l'étoposide est aussi un des médicaments largement utilisés en oncologie et fait partie d'un nombre assez important de protocoles de haute dose dont le protocole TICE. Jusqu'à présent, la méthode de détermination de dose de l'étoposide est toujours celle basée sur la BSA. Comme pour tous les cytotoxiques utilisés à haute dose, une maîtrise de l'exposition est primordiale. Dans les études évaluant l'efficacité et la tolérance du protocole TICE, seule la PK du carboplatine avait été étudiée montrant une forte variabilité interindividuelle de l'AUC malgré la prise en compte de la fonction rénale dans le calcul de dose. Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que cette variabilité peut être maîtrisée par le TDM. L'objectif de cette partie était donc d'étudier la PK de l'étoposide et, en plus, la pharmacogénétique, afin d'évaluer l'intérêt potentiel d'une adaptation individuelle de sa posologie.

Les analyses PK n'ont été réalisées que sur les données des patients de l'essai TICE (i.e., sans base de données de prélèvements riches comme pour les analyses du carboplatine). En outre, en raison du temps de perfusion différé (d'une heure) de celui du carboplatine et des prélèvements sanguins communs avec celui-ci, le nombre de concentrations au jour 3 de chaque cycle était insuffisant pour les analyses de données de chaque jour séparément. Ainsi, toutes les données (les 3 jours des 3 cycles) ont été analysées simultanément en implémentant un modèle de variabilité inter-occasion. Les résultats d'analyse ont montré que, contrairement au carboplatine, la variabilité de la clairance de l'étoposide chez les patients recevant le protocole TICE était modérée (de l'ordre de 16%). Cela pourrait être expliqué par son élimination à la fois rénale et par métabolisme hépatique ainsi que les caractéristiques physiologiques de ces patients particuliers (hommes jeunes ayant relativement une fonction rénale et hépatique normale).

Les covariables qui étaient associées à une diminution significative de l'OFV étaient celles liées à la fonction rénale et hépatique (Scr, rapport BW/Scr, CysC, ALB, PROT, BILI et BSA). Cependant lors des analyses simultanées de toutes les covariables significatives, seules le rapport BW/Scr et BILI étaient retenus. En se basant sur les études précédentes qui n'ont pas mis en évidence l'influence des covariables de la fonction hépatique sur la clairance et en raison du faible impact de BILI, nous avons décidé de ne pas retenir BILI dans l'équation finale. Néanmoins, la dose déterminée rétrospectivement en utilisant la clairance prédite par

l'équation finale (ne contenant que le rapport BW/Scr) n'a pas permis de réduire significativement la variabilité interindividuelle de l'AUC. Ce résultat montre que le calcul de dose en fonction de la surface corporelle est valide dans ce protocole. Malgré une variabilité limitée de l'exposition, une tendance vers une AUC plus élevée chez les patients répondant au traitement a été observée bien que la différence ne soit pas significative. Ce résultat pourrait indiquer que le niveau d'exposition à l'étoposide pourrait être un facteur contributif à la réponse tumorale. Quant à la toxicité hématologique, seule l'AUC moyenne des patients ayant eu une neutropénie tardive de grade 3-4 au cycle 3 était significativement plus élevée que celle des patients ayant eu une neutropénie tardive de grade 0-2. Au vu de ces résultats, nous ne sommes pas en mesure de proposer une AUC cible pour l'étoposide utilisé dans ce protocole TICE.

Notre étude est la première à mettre en évidence l'association entre le polymorphisme du gène UGT1A1 et la toxicité hématologique de l'étoposide. Nous avons observé que la proportion des patients ayant eu une neutropénie tardive est significativement plus importante chez les patients homozygotes mutés (i.e., porteurs de 2 allèles *28 qui diminuent l'expression de l'enzyme) que chez les patients homozygotes sauvages et hétérozygotes. De manière contre-intuitive, parmi les patients ayant les données du taux de neutrophiles tardif, il n'y a pas de différence significative entre la moyenne de clairance entre les deux groupes (*1/*1 & *1/*28 vs *28/*28), et l'UGT1A1 n'était pas une covariable significative sur la clairance lors des analyses sur NONMEM. Comme expliqué dans le manuscrit, ce fait pourrait s'expliquer par l'interaction au niveau de la fixation protéique entre l'étoposide et la bilirubine qui est aussi un substrat de l'UGT1A1. Chez les patients homozygotes mutés, la clairance intrinsèque de l'étoposide libre serait diminuée et sa fraction libre, augmentée (par déplacement de la liaison protéique par la bilirubine) entraînant, selon Stewart et al.¹⁴⁵, une augmentation de l'exposition à l'étoposide libre sans altérer la clairance systémique totale. Cette augmentation de l'exposition à l'étoposide libre serait à l'origine de la toxicité observée. En effet, de manière attendue, nous avons observé que la bilirubine totale était significativement élevée chez ces patients homozygotes mutés. Cependant, d'autres études prospectives seront nécessaires pour confirmer ce résultat et éventuellement proposer une adaptation de dose selon le polymorphisme des patients pour l'UGT1A1. Cette analyse PK et pharmacogénétique a montré que l'individualisation de dose de l'étoposide soit par une méthode a priori soit par un TDM ne sera pas nécessaire pour le protocole TICE. Le calcul de dose en fonction de la surface corporelle reste donc valide pour ce protocole.

Conclusion générale et perspectives

Pour un cancer curable tel que les tumeurs germinales, une maîtrise de l'exposition des cytotoxiques est primordiale pour éviter la sous- ou la sur-exposition au médicament qui peut être responsable, respectivement, d'une réponse tumorale insuffisante ou d'une toxicité excessive. Nos travaux ont montré que l'adaptation des doses du carboplatine au moyen d'un TDM a permis de réduire la variabilité de l'exposition comparativement aux méthodes *a priori* basées sur une prédiction de la clairance du carboplatine. Les résultats cliniques observés, tolérance satisfaisante et efficacité comparable à celle habituellement décrite pour des patients ayant de meilleurs facteurs pronostiques, justifient la mise en place de ce TDM de façon standard. Nos travaux ont également montré que le monitoring des concentrations plasmatique totales du carboplatine était possible quand l'ultrafiltration des prélèvements plasmatiques ne pouvait pas être réalisée, avec néanmoins des performances moindres que le TDM basé sur les concentrations ultrafiltrables.

Nos analyses pharmacogénétiques de l'ototoxicité du carboplatine ont permis d'identifier des variants associés à l'aggravation de l'atteinte auditive. Ces résultats devront être confirmés par des études prospectives car la puissance statistique de notre étude reste limitée.

Pour ce qui concerne l'étoposide, nos travaux de thèse ont montré que, dans le protocole de haute dose TICE, la variabilité interindividuelle de l'exposition était modérée et n'avait pas (ou de façon extrêmement marginale) d'implication clinique. Il n'y a pas donc lieu de pratiquer un TDM pour l'étoposide dans le cadre de ce protocole. Pour l'aspect pharmacogénétique, seul le polymorphisme d'UGT1A1 s'est avéré associé à la toxicité hématologique. Ce résultat justifie lui-aussi une évaluation prospective.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'améliorer notre connaissance sur la pharmacocinétique et pharmacogénétique de deux médicaments cytotoxiques importants utilisés dans le protocole TICE, permettant ainsi d'optimiser leur utilisation pour la prise en charge des patients traités par ce protocole.

Bien qu'une grande partie des analyses soit été réalisée dans le cadre de cet essai clinique TICE, un certain nombre de perspectives sont ouvertes par ces travaux. Elles concernent les analyses pharmacocinétiques mais surtout pharmacogénétiques.

Dans l'immédiat et à partir des données accumulées dans le cadre de cette étude TICE, dès que les données d'efficacité (survie sans progression de tous les patients) seront toutes disponibles, devra être évaluée l'implication des différents polymorphismes génétiques du carboplatine et de l'étoposide.

Des travaux à partir d'autres études, en cours ou à envisager, sont à considérer.

Premièrement, la performance de la formule TICE 3-cov doit être ré-évaluée par rapport à celle de Calvert-Jelliffe. Cette nouvelle formule qui était censé être adaptée aux patients de l'étude était comparable avec celle de Calvert-Jelliffe chez les patients du dataset prospectif du premier article. En revanche, si tous les patients ont été pris en compte, la formule de Calvert-Jelliffe avait tendance à sous-estimer la clairance du carboplatine entraînant une sous-exposition ($AUC < 18 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{mL}$ chez 10% des patients) alors que la TICE 3-cov était meilleure en terme de précision. Cependant, les données environ de deux tiers de patients ont été utilisées pour développer la formule TICE 3-cov, ce qui représentait un biais dans cette comparaison. L'utilisation des bases de données d'autres équipes [e.g., une étude (TIGER NCT02375204) en cours, comparant l'efficacité du protocole TICE avec celle du TIP (Paclitaxel+Ifosfamide+Cisplatine)] pour la comparaison des deux formules doit permettre d'avoir un résultat plus objectif.

Deuxièmement, les résultats pharmacogénétiques de l'ototoxicité méritent d'être confirmés par d'autres études, y compris dans le cadre de protocole à doses standards de cisplatine.

Références bibliographiques

1. Evans WE, Relling MV. Clinical pharmacokinetics-pharmacodynamics of anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16(6):327-336.
2. Freyer G, Ligneau B, Tranchand B, Ardiet C, Serre-Debeauvais F, Trillet-Lenoir V. Pharmacokinetic studies in cancer chemotherapy: usefulness in clinical practice. *Cancer Treat Rev.* 1997;23(3):153-169.
3. Masson E, Zamboni WC. Pharmacokinetic optimisation of cancer chemotherapy. Effect on outcomes. *Clin Pharmacokinet.* 1997;32(4):324-343.
4. Felici A, Verweij J, Sparreboom A. Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area. *Eur J Cancer.* 2002;38(13):1677-1684.
5. Paci A, Veal G, Bardin C, et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1--cytotoxics. *Eur J Cancer.* 2014;50(12):2010-2019.
6. Bardin C, Veal G, Paci A, et al. Therapeutic drug monitoring in cancer--are we missing a trick? *Eur J Cancer.* 2014;50(12):2005-2009.
7. Canal P, Chatelut E, Guichard S. Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy. *Drugs.* 1998;56(6):1019-1038.
8. Pinkel D. The use of body surface area as a criterion of drug dosage in cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 1958;18(7):853-856.
9. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(4):219-244.
10. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition.* 1989;5(5):303-311; discussion 312-313.
11. Dooley MJ, Poole SG. Poor correlation between body surface area and glomerular filtration rate. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(6):523-526.
12. Gurney H. Dose calculation of anticancer drugs: a review of the current practice and introduction of an alternative. *J Clin Oncol.* 1996;14(9):2590-2611.
13. Sawyer M, Ratain MJ. Body surface area as a determinant of pharmacokinetics and drug dosing. *Invest New Drugs.* 2001;19(2):171-177.

14. Miller AA. Body surface area in dosing anticancer agents: scratch the surface! *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(24):1822-1823.
15. Grochow LB, Baraldi C, Noe D. Is dose normalization to weight or body surface area useful in adults? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(4):323-325.
16. Kloft C, Siegert W, Jaehde U. Individualised dosing strategy for high-dose carboplatin in patients with germ cell cancer. *Br J Cancer.* 2003;89(5):787-794.
17. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(3):447-464.
18. Freyer G, Tranchand B, Ligneau B, et al. Population pharmacokinetics of doxorubicin, etoposide and ifosfamide in small cell lung cancer patients: results of a multicentre study. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50(4):315-324.
19. Livingston EH, Lee S. Body surface area prediction in normal-weight and obese patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(3):E586-591.
20. Chatelut E, Puisset F. The scientific basis of body surface area-based dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95(4):359-361.
21. Miller AA, Rosner GL, Egorin MJ, Hollis D, Lichtman SM, Ratain MJ. Prospective evaluation of body surface area as a determinant of paclitaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in women with solid tumors: Cancer and Leukemia Group B Study 9763. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8325-8331.
22. Egorin MJ. Horseshoes, hand grenades, and body-surface area-based dosing: aiming for a target. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):182-183.
23. Smorenburg CH, Sparreboom A, Bontenbal M, Stoter G, Nooter K, Verweij J. Randomized cross-over evaluation of body-surface area-based dosing versus flat-fixed dosing of paclitaxel. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):197-202.
24. Chatelut E, White-Koning ML, Mathijssen RH, Puisset F, Baker SD, Sparreboom A. Dose banding as an alternative to body surface area-based dosing of chemotherapeutic agents. *Br J Cancer.* 2012;107(7):1100-1106.
25. Plumridge RJ, Sewell GJ. Dose-banding of cytotoxic drugs: a new concept in cancer chemotherapy. *Am J Health Syst Pharm.* 2001;58(18):1760-1764.
26. Rousseau A, Marquet P. Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002;16(4):253-262.

27. van den Bongard HJGD, Math??t RA, Beijnen JH, Schellens JHM. Pharmacokinetically Guided Administration of Chemotherapeutic Agents: *Clinical Pharmacokinetics*. 2000;39(5):345-367.
28. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, et al. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett*. 2007;249(2):271-282.
29. Innocenti F, Ratain MJ. "Irinogenetics" and UGT1A: from genotypes to haplotypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75(6):495-500.
30. Lennard L. Therapeutic drug monitoring of cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52 Suppl 1:75S-87S.
31. Alnaim L. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract*. 2007;13(4):207-221.
32. Hon YY, Evans WE. Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: a multidisciplinary team approach. *Clin Chem*. 1998;44(2):388-400.
33. Meerm AF van der, Neef C. Optimal Sampling Times for Therapeutic Drug Monitoring. *Advances in Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 2012;0(0).
34. Sheiner LB, Beal S, Rosenberg B, Marathe VV. Forecasting individual pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 1979;26(3):294-305.
35. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res*. 1972;5(5):411-459.
36. Vučićević K, Miljković B, Kovačević SV, Todorović Z, Grabnar MP and I. Population Pharmacokinetic Analysis of Therapeutic Drug Monitoring Data in Optimizing Pharmacotherapy of Antiepileptic Drugs. *Novel Treatment of Epilepsy*. 2011.
37. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013;2:e38.
38. Mould DR, Upton RN. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2012;1(9):e6.
39. Savic RM, Karlsson MO. Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. *AAPS J*. 2009;11(3):558-569.
40. Nguyen THT, Mouksassi M-S, Holford N, et al. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(2):87-109.

41. Lee J, Lim M, Seong SJ, et al. Population pharmacokinetic analysis of the multiple peaks phenomenon in sumatriptan. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2015;23(2):66-74.
42. Chatelut E. [Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]. *Bull Cancer*. 2011;98(11):1253-1261.
43. Puisset F, Schmitt A, Chatelut E. Standardization of chemotherapy and individual dosing of platinum compounds. *Anticancer Res*. 2014;34(1):465-470.
44. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. 2003;103(3):645-662.
45. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1):9-23.
46. Fink D, Nebel S, Aebi S, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996;56(21):4881-4886.
47. Gould N, Sill MW, Mannel RS, et al. A phase I study with an expanded cohort to assess feasibility of intravenous docetaxel, intraperitoneal carboplatin and intraperitoneal paclitaxel in patients with previously untreated ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2012;127(3):506-510.
48. Jandial DA, Brady WE, Howell SB, et al. A phase I pharmacokinetic study of intraperitoneal bortezomib and carboplatin in patients with persistent or recurrent ovarian cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2017;145(2):236-242.
49. Duffull SB, Robinson BA. Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33(3):161-183.
50. Harland SJ, Newell DR, Siddik ZH, Chadwick R, Calvert AH, Harrap KR. Pharmacokinetics of cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum(II) in patients with normal and impaired renal function. *Cancer Res*. 1984;44(4):1693-1697.
51. Oguri S, Sakakibara T, Mase H, et al. Clinical pharmacokinetics of carboplatin. *J Clin Pharmacol*. 1988;28(3):208-215.
52. Calvert H, Judson I, van der Vijgh WJ. Platinum complexes in cancer medicine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity. *Cancer Surv*. 1993;17:189-217.

53. Gaver RC, Colombo N, Green MD, et al. The disposition of carboplatin in ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1988;22(3):263-270.
54. Elferink F, van der Vijgh WJ, Klein I, Vermorken JB, Gall HE, Pinedo HM. Pharmacokinetics of carboplatin after i.v. administration. *Cancer Treat Rep.* 1987;71(12):1231-1237.
55. Smeyers-Verbeke J, Detaevernier MR, Denis L, Massart DL. The determination of platinum in biological fluid by means of graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Clin Chim Acta.* 1981;113(3):329-333.
56. Hopfer SM, Ziebka L, Sunderman FW, Sporn JR, Greenberg BR. Direct analysis of platinum in plasma and urine by electrothermal atomic absorption spectrophotometry. *Ann Clin Lab Sci.* 1989;19(6):389-396.
57. Brouwers EEM, Tibben MM, Rosing H, et al. Sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry assay for the determination of platinum originating from cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate. *J Mass Spectrom.* 2006;41(9):1186-1194.
58. Zhang T, Cai S, Forrest WC, Mohr E, Yang Q, Forrest ML. Development and Validation of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Method for Quantitative Analysis of Platinum in Plasma, Urine, and Tissues. *Appl Spectrosc.* 2016;70(9):1529-1536.
59. Liu R, Wu P, Yang L, Hou X, Lv Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33(5):373-393.
60. Gaver RC, Deeb G. High-performance liquid chromatographic procedures for the analysis of carboplatin in human plasma and urine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;16(3):201-206.
61. Tyczkowska K, Page RL, Riviere JE. Determination of carboplatin in canine plasma by liquid chromatography with ultraviolet-visible detection and confirmation by atomic absorption spectroscopy. *J Chromatogr.* 1990;527(2):447-453.
62. Kizu R, Yamamoto T, Yokoyama T, Tanaka M, Miyazaki M. A sensitive postcolumn derivatization/UV detection system for HPLC determination of antitumor divalent and quadrivalent platinum complexes. *Chem Pharm Bull.* 1995;43(1):108-114.
63. Marsh KC, Sternson LA, Repta AJ. Post-column reaction detector for platinum(II) antineoplastic agents. *Anal Chem.* 1984;56(3):491-497.

64. Baumann RA, Gooijer C, Velthorst NH, Frei RW, Klein I, van der Vijgh WJ. Quantitative determination of cisplatin in body fluids by liquid chromatography with quenched phosphorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1987;5(2):165-170.
65. Parsons PJ, Morrison PF, LeRoy AF. Determination of platinum-containing drugs in human plasma by liquid chromatography with reductive electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1987;385:323-335.
66. Zufía L, Aldaz A, Castellanos C, Giráldez J. Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high-performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;764(1-2):457-464.
67. Burns RB, Burton RW, Albon SP, Embree L. Liquid chromatography--mass spectrometry for the detection of platinum antineoplastic complexes. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14(3):367-372.
68. Guo P, Li S, Gallo JM. Determination of carboplatin in plasma and tumor by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;783(1):43-52.
69. Falter R, Wilken RD. Determination of carboplatinum and cisplatinum by interfacing HPLC with ICP-MS using ultrasonic nebulisation. *Sci Total Environ.* 1999;225(1-2):167-176.
70. Hann S, Stefánka Z, Lenz K, Stingeder G. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2005;381(2):405-412.
71. Desjardins C, Saxton P, Lu SX, Li X, Rowbottom C, Wong YN. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the clinical combination study of carboplatin and anti-tumor agent eribulin mesylate (E7389) in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;875(2):373-382.
72. Ito H, Yamaguchi H, Fujikawa A, et al. Quantification of intact carboplatin in human plasma ultrafiltrates using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;917-918:18-23.
73. Belani CP, Egorin MJ, Abrams JS, et al. A novel pharmacodynamically based approach to dose optimization of carboplatin when used in combination with etoposide. *J Clin Oncol.* 1989;7(12):1896-1902.

74. Sørensen BT, Strömgen A, Jakobsen P, Jakobsen A. Dose-toxicity relationship of carboplatin in combination with cyclophosphamide in ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;28(5):397-401.
75. Chatelut E, Chevreau C, Brunner V, et al. A pharmacologically guided phase I study of carboplatin in combination with methotrexate and vinblastine in advanced urothelial cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;35(5):391-396.
76. Belani CP, Kearns CM, Zuhowski EG, et al. Phase I trial, including pharmacokinetic and pharmacodynamic correlations, of combination paclitaxel and carboplatin in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):676-684.
77. Jodrell DI, Egorin MJ, Canetta RM, et al. Relationships between carboplatin exposure and tumor response and toxicity in patients with ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1992;10(4):520-528.
78. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, et al. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol.* 1989;7(11):1748-1756.
79. Alberts DS, Garcia DJ. Total platinum dose versus platinum dose intensification in ovarian cancer treatment. *Semin Oncol.* 1994;21(2 Suppl 2):11-15; quiz 16, 58.
80. Calvert AH, Boddy A, Bailey NP, et al. Carboplatin in combination with paclitaxel in advanced ovarian cancer: dose determination and pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. *Semin Oncol.* 1995;22(5 Suppl 12):91-98; discussion 99-100.
81. Kearns CM, Egorin MJ. Considerations regarding the less-than-expected thrombocytopenia encountered with combination paclitaxel/carboplatin chemotherapy. *Semin Oncol.* 1997;24(1 Suppl 2):S2-91-S2-96.
82. Calvert AH. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of combination carboplatin/paclitaxel. *Semin Oncol.* 1997;24(1 Suppl 2):S2-85-S2-90.
83. Egorin MJ, Van Echo DA, Olman EA, Whitacre MY, Forrest A, Aisner J. Prospective validation of a pharmacologically based dosing scheme for the cis-diamminedichloroplatinum(II) analogue diamminecyclobutanedicarboxylatoplatinum. *Cancer Res.* 1985;45(12 Pt 1):6502-6506.
84. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976;16(1):31-41.
85. Jelliffe RW. Letter: Creatinine clearance: bedside estimate. *Ann Intern Med.* 1973;79(4):604-605.

86. Chatelut E, Canal P, Brunner V, et al. Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(8):573-580.
87. Bénézet S, Guimbaud R, Chatelut E, Chevreau C, Bugat R, Canal P. How to predict carboplatin clearance from standard morphological and biological characteristics in obese patients. *Ann Oncol.* 1997;8(6):607-609.
88. Léger F, Séronie-Vivien S, Makdessi J, et al. Impact of the biochemical assay for serum creatinine measurement on the individual carboplatin dosing: a prospective study. *Eur J Cancer.* 2002;38(1):52-56.
89. Thomas F, Séronie-Vivien S, Gladieff L, et al. Cystatin C as a new covariate to predict renal elimination of drugs: application to carboplatin. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(12):1305-1316.
90. Kar S, Paglialunga S, Islam R. Cystatin C Is a More Reliable Biomarker for Determining eGFR to Support Drug Development Studies. *J Clin Pharmacol.* May 2018.
91. Ferguson TW, Komenda P, Tangri N. Cystatin C as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(3):295-300.
92. Levey AS, Berg RL, Gassman JJ, Hall PM, Walker WG. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. *Kidney Int Suppl.* 1989;27:S73-80.
93. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids. *Clin Nephrol.* 1992;38 Suppl 1:S20-27.
94. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J.* 1990;268(2):287-294.
95. Newman DJ. Cystatin C. *Ann Clin Biochem.* 2002;39(Pt 2):89-104.
96. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney International.* 2009;75(6):652-660.
97. Schmitt A, Gladieff L, Lansiaux A, et al. A universal formula based on cystatin C to perform individual dosing of carboplatin in normal weight, underweight, and obese patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3633-3639.
98. Sinkule JA. Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy.* 1984;4(2):61-73.

99. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*. 1998;34(10):1514-1521.
100. Toffoli G, Corona G, Basso B, Boiocchi M. Pharmacokinetic optimisation of treatment with oral etoposide. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(7):441-466.
101. Voutsadakis IA. A Systematic Review and Pooled Analysis of Studies of Oral Etoposide in Metastatic Breast Cancer. *Eur J Breast Health*. 2018;14(1):10-16.
102. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*. 2015;14:95-108.
103. Clark PI, Slevin ML. The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet*. 1987;12(4):223-252.
104. D'Incalci M, Erba E, Vaghi M, Morasca L. In vitro cytotoxicity of VP 16 on primary tumor and metastasis of Lewis lung carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1982;18(4):377-380.
105. Roed H, Vindelov LL, Christensen IJ, Spang-Thomsen M, Hansen HH. The effect of the two epipodophyllotoxin derivatives etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) on cell lines established from patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;19(1):16-20.
106. Matsushima Y, Kanzawa F, Hoshi A, et al. Time-schedule dependency of the inhibiting activity of various anticancer drugs in the clonogenic assay. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1985;14(2):104-107.
107. Slevin ML, Clark PI, Joel SP, et al. A randomized trial to evaluate the effect of schedule on the activity of etoposide in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1989;7(9):1333-1340.
108. Abratt RP, Willcox PA, de Groot M, Goodman HT, Jansen ER, Salton DG. Prospective study of etoposide scheduling in combination chemotherapy for limited disease small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*. 1991;27(1):28-30.
109. Clark PI, Slevin ML, Joel SP, et al. A randomized trial of two etoposide schedules in small-cell lung cancer: the influence of pharmacokinetics on efficacy and toxicity. *J Clin Oncol*. 1994;12(7):1427-1435.
110. Sprinz E, Caldas AP, Mans DR, et al. Fractionated doses of oral etoposide in the treatment of patients with aids-related kaposi sarcoma: a clinical and pharmacologic study to improve therapeutic index. *Am J Clin Oncol*. 2001;24(2):177-184.
111. Stewart DJ, Nundy D, Maroun JA, Tetreault L, Prior J. Bioavailability, pharmacokinetics, and clinical effects of an oral preparation of etoposide. *Cancer Treat Rep*. 1985;69(3):269-273.

112. Slevin ML. The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer*. 67(S1):319-329.
113. Hande KR. Etoposide pharmacology. *Semin Oncol*. 1992;19(6 Suppl 13):3-9.
114. Hande KR, Krozely MG, Greco FA, Hainsworth JD, Johnson DH. Bioavailability of low-dose oral etoposide. *J Clin Oncol*. 1993;11(2):374-377.
115. Colombo T, Brogгинi M, Torti L, Erba E, D'Incalci M. Pharmacokinetics of VP16-213 in Lewis lung carcinoma bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1982;7(2-3):127-131.
116. D'Incalci M, Farina P, Sessa C, et al. Pharmacokinetics of VP16-213 given by different administration methods. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1982;7(2-3):141-145.
117. Hande KR, Wedlund PJ, Noone RM, Wilkinson GR, Greco FA, Wolff SN. Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res*. 1984;44(1):379-382.
118. Relling MV, McLeod HL, Bowman LC, Santana VM. Etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and chronic exposure to cisplatin. *Clin Pharmacol Ther*. 1994;56(5):503-511.
119. Creaven PJ, Allen LM. EPEG, a new antineoplastic epipodophyllotoxin. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18(2):221-226.
120. Stewart CF, Pieper JA, Arbuck SG, Evans WE. Altered protein binding of etoposide in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 1989;45(1):49-55.
121. Fleming RA, Evans WE, Arbuck SG, Stewart CF. Factors affecting in vitro protein binding of etoposide in humans. *J Pharm Sci*. 1992;81(3):259-264.
122. Yang J, Bogni A, Schuetz EG, et al. Etoposide pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(7):552-553.
123. Arbuck SG, Douglass HO, Crom WR, et al. Etoposide pharmacokinetics in patients with normal and abnormal organ function. *J Clin Oncol*. 1986;4(11):1690-1695.
124. Slevin ML, Joel SP, Whomsley R, et al. The effect of dose on the bioavailability of oral etoposide: confirmation of a clinically relevant observation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(5):329-331.
125. Režonja Kukec R, Grabnar I, Mrhar A, Čebren Lipovec N, Čufer T, Vovk T. A simple dried blood spot method for clinical pharmacological analyses of etoposide in cancer patients using liquid chromatography and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*. 2016;452:99-105.

126. Ratain MJ, Mick R, Schilsky RL, Vogelzang NJ, Berezin F. Pharmacologically based dosing of etoposide: a means of safely increasing dose intensity. *J Clin Oncol.* 1991;9(8):1480-1486.
127. Minami H, Shimokata K, Saka H, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of a 14-day infusion of etoposide in patients with lung cancer. *J Clin Oncol.* 1993;11(8):1602-1608.
128. Grunberg SM, Crowley J, Hande KR, et al. Treatment of poor-prognosis extensive disease small-cell lung cancer with an all-oral regimen of etoposide and cyclophosphamide - a Southwest Oncology Group clinical and pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(6):461-468.
129. Sessa C, Zucchetti M, Torri V, et al. Chronic oral etoposide in small-cell lung cancer: clinical and pharmacokinetic results. *Ann Oncol.* 1993;4(7):553-558.
130. Zucchetti M, Pagani O, Torri V, et al. Clinical pharmacology of chronic oral etoposide in patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1995;1(12):1517-1524.
131. Miller AA, Tolley EA, Niell HB, Stewart CF, Griffin JP. Pharmacodynamics of three daily infusions of etoposide in patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;31(2):161-166.
132. Miller AA, Rosner GL, Ratain MJ, Hollis DR, Green MR, Schilsky RL. Pharmacology of 21-day oral etoposide given in combination with i.v. cisplatin in patients with extensive-stage small cell lung cancer: a cancer and leukemia group B study (CALGB 9062). *Clin Cancer Res.* 1997;3(5):719-725.
133. Miller AA, Tolley EA, Niell HB. Therapeutic drug monitoring of 21-day oral etoposide in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4(7):1705-1710.
134. Shaffer DW, Smith LS, Burris HA, et al. A randomized phase I trial of chronic oral etoposide with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced malignancies. *Cancer Res.* 1993;53(24):5929-5933.
135. Marzola M, Zucchetti M, Colombo N, et al. Low-dose oral etoposide in epithelial cancer of the ovary. *Ann Oncol.* 1993;4(6):517-519.
136. Robert F, Chen S, Miller AA, Lee BC, Molthrop DC, Wheeler RH. Phase I and pharmacologic study of 7- and 21-day continuous etoposide infusion in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;38(5):459-465.

137. Millward MJ, Newell DR, Yuen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of prolonged oral etoposide in women with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;37(1-2):161-167.
138. Sessa C, Zucchetti M, Cerny T, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral etoposide phosphate. *JCO.* 1995;13(1):200-209.
139. de Jong RS, Mulder NH, Uges DR, et al. Randomized comparison of etoposide pharmacokinetics after oral etoposide phosphate and oral etoposide. *Br J Cancer.* 1997;75(11):1660-1666.
140. Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, Evans WE. Relation of systemic exposure to unbound etoposide and hematologic toxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;50(4):385-393.
141. Perdaems N, Bachaud JM, Rouzard P, et al. Relation between unbound plasma concentrations and toxicity in a prolonged oral etoposide schedule. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(9-10):677-683.
142. You B, Tranchand B, Girard P, et al. Etoposide pharmacokinetics and survival in patients with small cell lung cancer: a multicentre study. *Lung Cancer.* 2008;62(2):261-272.
143. Kintzel PE, Dorr RT. Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function. *Cancer Treat Rev.* 1995;21(1):33-64.
144. Joel SP, Shah R, Clark PI, Slevin ML. Predicting etoposide toxicity: relationship to organ function and protein binding. *J Clin Oncol.* 1996;14(1):257-267.
145. Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, Evans WE. Changes in the clearance of total and unbound etoposide in patients with liver dysfunction. *J Clin Oncol.* 1990;8(11):1874-1879.
146. Stewart CF, Fleming RA, Arbuck SG, Evans WE. Prospective evaluation of a model for predicting etoposide plasma protein binding in cancer patients. *Cancer Res.* 1990;50(21):6854-6856.
147. Nguyen L, Chatelut E, Chevreau C, et al. Population pharmacokinetics of total and unbound etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;41(2):125-132.
148. Joel SP, Ellis P, O'Byrne K, et al. Therapeutic monitoring of continuous infusion etoposide in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1996;14(6):1903-1912.
149. Strömngren AS, Sørensen BT, Jakobsen P, Jakobsen A. A limited sampling method for estimation of the etoposide area under the curve. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;32(3):226-230.

150. Tranchand B, Amsellem C, Chatelut E, et al. A limited-sampling strategy for estimation of etoposide pharmacokinetics in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43(4):316-322.
151. Ciccolini J, Monjanel-Mouterde S, Bun S-S, et al. Population pharmacokinetics of etoposide: application to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2002;24(6):709-714.
152. Bray F, Richiardi L, Ekblom A, Pukkala E, Cuninkova M, Møller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3099-3111.
153. Oldenburg J, Fosså SD, Nuver J, et al. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi125-132.
154. Foulkes WD, Cooney KA, eds. *Male Reproductive Cancers: Epidemiology, Pathology and Genetics.* New York: Springer-Verlag; 2010.
155. Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al. EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update. *Eur Urol.* 2011;60(2):304-319.
156. Kondagunta GV, Bacik J, Donadio A, et al. Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6549-6555.
157. Harstrick A, Schmoll HJ, Wilke H, et al. Cisplatin, etoposide, and ifosfamide salvage therapy for refractory or relapsing germ cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1991;9(9):1549-1555.
158. Loehrer PJ, Lauer R, Roth BJ, Williams SD, Kalasinski LA, Einhorn LH. Salvage therapy in recurrent germ cell cancer: ifosfamide and cisplatin plus either vinblastine or etoposide. *Ann Intern Med.* 1988;109(7):540-546.
159. Loehrer PJ, Gonin R, Nichols CR, Weathers T, Einhorn LH. Vinblastine plus ifosfamide plus cisplatin as initial salvage therapy in recurrent germ cell tumor. *J Clin Oncol.* 1998;16(7):2500-2504.
160. McCaffrey JA, Mazumdar M, Bajorin DF, Bosl GJ, Vlamis V, Motzer RJ. Ifosfamide- and cisplatin-containing chemotherapy as first-line salvage therapy in germ cell tumors: response and survival. *J Clin Oncol.* 1997;15(7):2559-2563.
161. Motzer RJ, Bajorin DF, Vlamis V, Weisen S, Bosl GJ. Ifosfamide-based chemotherapy for patients with resistant germ cell tumors: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Semin Oncol.* 1992;19(6 Suppl 12):8-11.

162. Motzer RJ, Geller NL, Tan CC, et al. Salvage chemotherapy for patients with germ cell tumors. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience (1979-1989). *Cancer*. 1991;67(5):1305-1310.
163. Motzer RJ, Mazumdar M, Sheinfeld J, et al. Sequential dose-intensive paclitaxel, ifosfamide, carboplatin, and etoposide salvage therapy for germ cell tumor patients. *J Clin Oncol*. 2000;18(6):1173-1180.
164. Kondagunta GV, Bacik J, Sheinfeld J, et al. Paclitaxel plus Ifosfamide followed by high-dose carboplatin plus etoposide in previously treated germ cell tumors. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):85-90.
165. Feldman DR, Sheinfeld J, Bajorin DF, et al. TI-CE high-dose chemotherapy for patients with previously treated germ cell tumors: results and prognostic factor analysis. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1706-1713.
166. Huitema ADR, Spaander M, Mathijt R a. A, et al. Relationship between exposure and toxicity in high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Ann Oncol*. 2002;13(3):374-384.
167. van Warmerdam LJ, Rodenhuis S, van der Wall E, Maes RA, Beijnen JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of carboplatin administered in a high-dose combination regimen with thiotepa, cyclophosphamide and peripheral stem cell support. *Br J Cancer*. 1996;73(8):979-984.
168. Dubs A, Jacky E, Stahel R, Taverna C, Honegger H. Ototoxicity in patients with dose-intensive therapy for cisplatin-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1158; author reply 1158-1159.
169. Wandt H, Birkmann J, Denzel T, et al. Sequential cycles of high-dose chemotherapy with dose escalation of carboplatin with or without paclitaxel supported by G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells: a phase I/II study in advanced ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(8):763-770.
170. Chevreau C, Massard C, Flechon A, et al. Phase II trial of TI-CE high dose chemotherapy (HDCT) with drug monitoring for individual carboplatin dosing in patients with relapsed advanced germ cell tumors: A multicentric prospective GETUG trial. *J Clin Oncol*. 2017;35(suppl 6S):abstract 401.
171. de Jonge ME, Huitema ADR, Tukker AC, van Dam SM, Rodenhuis S, Beijnen JH. Accuracy, feasibility, and clinical impact of prospective Bayesian pharmacokinetically guided dosing of cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin in high-dose chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):273-283.

172. Ross CJD, Katzov-Eckert H, Dubé M-P, et al. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet.* 2009;41(12):1345-1349.
173. Mukherjea D, Rybak LP. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics.* 2011;12(7):1039-1050.
174. Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72(8):931-935.
175. Ekborn A, Laurell G, Andersson A, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Cisplatin-induced hearing loss: influence of the mode of drug administration in the guinea pig. *Hear Res.* 2000;140(1-2):38-44.
176. Karasawa T, Steyger PS. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett.* 2015;237(3):219-227.
177. Nitz A, Kontopantelis E, Bielack S, et al. Prospective evaluation of cisplatin- and carboplatin-mediated ototoxicity in paediatric and adult soft tissue and osteosarcoma patients. *Oncol Lett.* 2013;5(1):311-315.
178. Qaddoumi I, Bass JK, Wu J, et al. Carboplatin-associated ototoxicity in children with retinoblastoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(10):1034-1041.
179. Tagger: Selection and evaluation of tag SNPs.
180. Pussegoda K, Ross CJ, Visscher H, et al. Replication of TPMT and ABCC3 genetic variants highly associated with cisplatin-induced hearing loss in children. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(2):243-251.
181. Bhavsar AP, Gunaretnam EP, Li Y, Hasbullah JS, Carleton BC, Ross CJD. Pharmacogenetic variants in TPMT alter cellular responses to cisplatin in inner ear cell lines. *PLoS ONE.* 2017;12(4):e0175711.
182. Talach T, Rottenberg J, Gal B, et al. Genetic risk factors of cisplatin induced ototoxicity in adult patients. *Neoplasma.* 2016;63(2):263-268.
183. Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, et al. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J.* 2008;8(1):23-28.
184. Caronia D, Patiño-García A, Milne RL, et al. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(5):347-353.

185. Xu X, Ren H, Zhou B, et al. Prediction of copper transport protein 1 (CTR1) genotype on severe cisplatin induced toxicity in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer*. 2012;77(2):438-442.
186. Drögemöller BI, Brooks B, Critchley C, et al. Further Investigation of the Role of ACYP2 and WFS1 Pharmacogenomic Variants in the Development of Cisplatin-Induced Ototoxicity in Testicular Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):1866-1871.
187. Thiesen S, Yin P, Jorgensen AL, et al. TPMT, COMT and ACYP2 genetic variants in paediatric cancer patients with cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenet Genomics*. 2017;27(6):213-222.
188. Vos HI, Guchelaar H-J, Gelderblom H, et al. Replication of a genetic variant in ACYP2 associated with cisplatin-induced hearing loss in patients with osteosarcoma. *Pharmacogenet Genomics*. 2016;26(5):243-247.
189. Xu H, Robinson GW, Huang J, et al. Common variants in ACYP2 influence susceptibility to cisplatin-induced hearing loss. *Nat Genet*. 2015;47(3):263-266.
190. Choeyprasert W, Sawangpanich R, Lertsukprasert K, et al. Cisplatin-induced ototoxicity in pediatric solid tumors: the role of glutathione S-transferases and megalin genetic polymorphisms. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;35(4):e138-143.
191. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol*. 2007;25(6):708-714.
192. Lui G, Bouazza N, Denoyelle F, et al. Association between genetic polymorphisms and platinum-induced ototoxicity in children. *Oncotarget*. 2018;9(56):30883-30893.
193. Lanvers-Kaminsky C, Sprowl JA, Malath I, et al. Human OCT2 variant c.808G>T confers protection effect against cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics*. 2015;16(4):323-332.
194. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62(1):60-73.
195. Aebi S, Christen R, Naredi P, et al. Synergy between cisplatin and an inhibitor of S-adenosylmethionine dependent transmethyltion in human ovarian adenocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 1997;11(4):869-874.
196. Ochoa B, Bobadilla N, Arrellín G, Herrera LA. S-Adenosyl-L-methionine increases serum BUN and creatinine in cisplatin-treated mice. *Arch Med Res*. 2009;40(1):54-58.

197. Langer T, am Zehnhoff-Dinnesen A, Radtke S, Meitert J, Zolk O. Understanding platinum-induced ototoxicity. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(8):458-469.
198. Palodetto B, Postal M, Grignoli CRE, Sartorato EL, Oliveira CA de. Influence of glutathione s-transferase on the ototoxicity caused by aminoglycosides. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(3):306-309.
199. Degl'Innocenti D, Marzocchini R, Rosati F, Cellini E, Raugei G, Ramponi G. Acylphosphatase expression during macrophage differentiation and activation of U-937 cell line. *Biochimie*. 1999;81(11):1031-1035.
200. Fuchs PA. A "calcium capacitor" shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J Physiol (Lond)*. 2014;592(16):3393-3401.
201. Rouillon C, White MF. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res Microbiol*. 2011;162(1):19-26.
202. Guthrie OW, Li-Korotky H-S, Durrant JD, Balaban C. Cisplatin induces cytoplasmic to nuclear translocation of nucleotide excision repair factors among spiral ganglion neurons. *Hear Res*. 2008;239(1-2):79-91.
203. Tauris J, Christensen EI, Nykjaer A, Jacobsen C, Petersen CM, Ovesen T. Cubilin and megalin co-localize in the neonatal inner ear. *Audiol Neurootol*. 2009;14(4):267-278.
204. Koepsell H, Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):666-676.
205. Ciarimboli G, Schlatter E. Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch*. 2005;449(5):423-441.
206. Ciarimboli G. Organic cation transporters. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):936-971.
207. Holzer AK, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 2004;66(4):817-823.
208. More SS, Akil O, Ianculescu AG, Geier EG, Lustig LR, Giacomini KM. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J Neurosci*. 2010;30(28):9500-9509.
209. Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol*. 2004;66(1):25-32.
210. Sun S, Cai J, Yang Q, Zhao S, Wang Z. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets. *Oncotarget*. 2017;8(9):16036-16051.

211. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009;3(3):281-290.
212. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, et al. A Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT) Gene Is Overexpressed in Cisplatin-resistant Human Cancer Cell Lines with Decreased Drug Accumulation. *Cancer Res*. 1996;56(18):4124-4129.
213. Rosenfeld JM, Vargas R, Xie W, Evans RM. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol Endocrinol*. 2003;17(7):1268-1282.
214. Zhang B, Xie W, Krasowski MD. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1695-1709.
215. Buchard A, Sanchez JJ, Dalhoff K, Morling N. Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant. *J Mol Diagn*. 2007;9(5):612-617.
216. rs2227291 (SNP) - Genes and regulation - Homo sapiens - Ensembl genome browser 93.
217. Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9(16 Pt 1):5853-5859.
218. Samimi G, Safaei R, Katano K, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10(14):4661-4669.
219. Li T, Peng J, Zeng F, et al. Association between polymorphisms in CTR1, CTR2, ATP7A, and ATP7B and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2017;55(10):774-780.
220. Lang T, Hitzl M, Burk O, et al. Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics*. 2004;14(3):155-164.
221. Soliman SE, D'Silva CN, Dimaras H, Dzneladze I, Chan H, Gallie BL. Clinical and genetic associations for carboplatin-related ototoxicity in children treated for retinoblastoma: A retrospective noncomparative single-institute experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(5):e26931.
222. rs2075252 (SNP) - Phenotype Data - Homo sapiens - Ensembl genome browser 93.

Annexe 1

Code implémenté dans NONMEM (control stream) pour l'analyse des données PK du carboplatine pour le 1^{er} article

```
$PROBLEM CLs individuelles C1J1
$INPUT ID TIME DV MDV AMT RATE EVID BSA
$DATA 89C1J1.prn IGNORE='C'
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4
$PK

TVCL=THETA(1)
CL=TVCL*EXP(ETA(1))
TVV1=THETA(2)*BSA
TVQ=THETA(3)
;TVV2=THETA(4)
TVV2=THETA(4)*BSA
V1=TVV1*EXP(ETA(2))
Q=TVQ*EXP(ETA(3))
V2=TVV2*EXP(ETA(4))
S1=V1
AUC=AMT/CL

$THETA (1,7,18) ; CL
$THETA (1,3,4,20) ; V1
$THETA (0.1,9.4,20) ; Q
$THETA (3.8,4,) ; V2

$OMEGA 0.01 ; iiv CL
$OMEGA 0.01 ; iiv V1
$OMEGA 0 FIXED ; iiv Q
$OMEGA 0.05 ; iiv V2

$ERROR
DEL=0
IF (F.EQ.0) DEL=1
W=F+DEL
Y=F+W*EPS(1)
IPRED=F
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

$SIGMA .1

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION SIGDIGITS=3 POSTHOC NOABORT

$COVARIANCE PRINT=E

$TABLE ID TIME DV AMT RATE CL AUC TVCL V1 V2 Q IPRED PRED IWRES
MDV ONEHEADER NOPRINT FILE=89C1J1PARAM.PAR
$TABLE ID TIME IPRED IWRES NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab1
$TABLE ID CL V1 Q V2 ETA(1) ETA(2) ETA(3) ETA(4)
NOPRINT ONEHEADER FILE=pattab1
```

Annexe 2

Code implémenté dans NONMEM (control stream) pour l'estimation de la CL_{UF} par le modèle tricompartimental du 2^{ème} article

\$PROB Modèle tricompart pour l'estimation de la CLUF
\$INPUT ETU ID TIME DV MDV AMT RATE EVID TYP BSA PROT ALBU WT AGE SEX SCrC SCrI CysC

\$DATA MBdatasetnew.PRN IGNORE=C NULL=.

\$SUBROUTINES ADVAN6 TOL=3
\$MODEL NCOMPARTMENTS=3 COMP(CU) COMP(PERIF) COMP(BOUND)

\$PK
TVCL10=THETA(1)
CL10=TVCL10*EXP(ETA(1))
TVV1=THETA(2)*(BSA/100)
V1=TVV1*EXP(ETA(2))
Q=THETA(3)*EXP(ETA(3))
TVV2=THETA(4)*(BSA/100)
V2=TVV2*EXP(ETA(4))
TVK13=THETA(5)
K13=THETA(5)*EXP(ETA(5))
TVK30=THETA(6)
K30=THETA(6)*EXP(ETA(6))
V3=THETA(7)*EXP(ETA(7))

K12=Q/V1
K21=Q/V2
K10=CL10/V1
FM=K13/(K13+K10)
CLUF=CL10/(1-FM)
AUCUF=AMT/CLUF

\$DES
DADT(1)=- (K10+K12+K13)*A(1)+K21*A(2)
DADT(2)=K12*A(1)-K21*A(2)
DADT(3)=K13*A(1)-K30*A(3)

\$THETA
(1,6.5,) ;CL10
(1,10.5,) ;V1
(1,5,) ;Q
(1,10.5,) ;V2
(0.0001,0.055,5) ; K13
(0.0001, 0.003,5) ; K30
(1,28,) ; V3

\$OMEGA
0.05 ; iiv CL10
0.05 ; iiv V1
0 FIXED ; iiv Q
0.1 ; iiv V2
0.5 ; iiv K13

0.5 ; iiv K30
0 FIXED ; iiv V3

\$ERROR

IF(TYP.EQ.1)IPRED=A(1)/V1

IF(TYP.EQ.12)IPRED=A(1)/V1+A(3)/V3

IRES=DV-IPRED

IF(TYP.EQ.1)Y=IPRED*EXP((EPS(1)*(1-ETU))+(ETU*EPS(2)))

IF(TYP.EQ.12)Y=IPRED*EXP((EPS(3)*(1-ETU))+(ETU*EPS(4)))

C3=IPRED-A(1)/V1

\$SIGMA

0.0234 ; eps1 UF Optimum Carbo

0.0474 ; eps2 UF TICE

0.04 ; eps3 PL Optimum Carbo

0.02 ; eps4 PL TICE

\$EST METHOD=1 INTERACTION NSIG=2 NOABORT MAXEVAL=9000 POSTHOC

\$COV

MATRIX=S

\$TABLE

ID TIME ETU MDV AMT IPRED CWRES TYP FM ETA(1) ETA(2) ETA(3) ETA(4) ETA(5) ETA(6)

CL10 CLUF AUCUF V1 Q V2 K13 K10 K21 K12 K30 C3

NOPRINT ONEHEADER

FILE=test.TAB

Annexe 3

Code implémenté dans NONMEM (control stream) pour l'estimation de la CL_{PL} par le modèle bicompartimental du 2^{ème} article

```
$PROBLEM Modèle bicomp pour déterminer CLPL
$INPUT ALEA ETU ID TIME      DV MDV AMT RATE EVID TYP BSA
$DATA PLMBdataset.prn
IGNORE=C NULL=.
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4

$PK
TVCL=THETA(1)
CL=TVCL*EXP(ETA(1))
TVV1=THETA(2)*BSA
TVQ=THETA(3)
TVV2=THETA(4)*BSA
V1=TVV1*EXP(ETA(2))
Q=TVQ*EXP(ETA(3))
V2=TVV2*EXP(ETA(4))
S1=V1
AUC=AMT/CL

$THETA
(0, 6.5,) ; CL
(0, 10,) ; V1
(0, 4,)   ; Q
(0, 10,) ; V2

$OMEGA 0.1      ; iiv CL
$OMEGA 0.1      ; iiv V1
$OMEGA 0 FIX    ; iiv Q
$OMEGA 0.1      ; iiv V2

$ERROR
DEL=0
IF (F.EQ.0) DEL=1
W=F+DEL
Y=F+W*EPS(1)
IPRED=F
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

$SIGMA 0.01

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION SIGDIGITS=3 POSTHOC NOABORT

$COVARIANCE MATRIX=S

$TABLE ID MDV ETU TIME CL AUC TVCL DV V1 V2 Q IPRED PRED IWRES ONEHEADER
NOPRINT FILE=PLMB.TAB
```

TITLE

Evaluation of therapeutic drug monitoring of carboplatin and pharmacokinetic /pharmacogenetic study of etoposide in a phase II clinical trial of dose intensification in oncology

SUMMARY

The TI-CE protocol ((Taxol, Ifosfamide, Carboplatin and Etoposide) is the standard treatment of germ cell tumor refractory to first-line chemotherapy or relapsed germ cell tumor having unfavorable prognostic features. A phase II study was conducted and consisted in adapting the dose of (high dose) carboplatin using therapeutic drug monitoring (TDM) of unbound concentrations instead of the usual method of dose individualization based on a target area under the curve (AUC) of unbound concentrations and predicted unbound clearance.

Pharmacokinetic analyses carried out in the context of this thesis have demonstrated the feasibility of conducting the TDM as well as its performance in terms of controlling the variability of AUC of carboplatin in the TI-CE protocol. However, the use of this practice is limited, in some hospitals, by material and human constraints related to the ultrafiltration of plasma samples to obtain unbound concentrations. A method was developed and validated to enable the use of total plasma concentrations for the TDM instead of unbound concentrations. Furthermore, the pharmacokinetic study of etoposide, used in combination with carboplatin during the dose intensification phase of the protocol, showed that the usual dose calculation method based on body surface area is associated with a low interindividual variability of exposure and that TDM is, therefore, not necessary for this drug. Finally, the role of different genetic factors in the ototoxicity of carboplatin and in the pharmacology of etoposide was also assessed. In conclusion, these analyses help to improve the level of care of patients treated with this protocol of high dose carboplatin and etoposide as well as our current knowledge of these two important cytotoxic drugs.

Key words : Therapeutic drug monitoring, carboplatin, etoposide, pharmacokinetic, pharmacogenetic, high doses

AUTEUR : Sotheara MOEUNG

TITRE : Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du carboplatine et étude pharmacocinétique/pharmacogénétique de l'étoposide dans le cadre d'un essai clinique de phase II d'intensification thérapeutique en cancérologie

DIRECTEURS DE THESE : Pr. Etienne CHATELUT et Dr. Fabienne THOMAS

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Mardi 16 octobre 2018, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

RESUME en français

Le protocole TICE (Taxol, Ifosfamide, Carboplatine et Etoposide) représente le traitement standard du cancer germinale réfractaire en première ligne ou en rechute de mauvais pronostic. Une étude de phase II a été réalisée consistant en une adaptation de posologie du carboplatine (utilisé à haute dose) basée sur un suivi thérapeutique pharmacologique (TDM) de ses concentrations ultrafiltrables (UF) alors que les pratiques habituelles se limitent à des doses calculées à partir d'une valeur cible de l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations UF et la clairance UF prédite du patient.

Les analyses pharmacocinétiques effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis de démontrer la faisabilité du TDM ainsi que sa performance dans la maîtrise de l'AUC du carboplatine utilisé dans le protocole TICE. Cependant, la réalisation de cette pratique est limitée, dans certains hôpitaux, par les contraintes matérielles et humaines liées à l'obtention des concentrations UF par l'ultrafiltration des prélèvements plasmatiques. Une méthodologie a donc été développée et validée pour permettre la réalisation du TDM à partir des concentrations plasmatiques totales. Par ailleurs, l'étude pharmacocinétique réalisée pour l'étoposide, médicament associé au carboplatine dans la phase d'intensification de ce protocole, indique que le calcul actuel de la dose en fonction de la surface corporelle s'accompagne d'une variabilité interindividuelle limitée de l'exposition et qu'il n'y a pas lieu de pratiquer un TDM pour ce médicament. Enfin, l'implication de différents facteurs génétiques correspondant, d'une part, à la toxicité auditive du carboplatine et, d'autre part, à la pharmacologie de l'étoposide a été aussi évaluée. En conclusion, ces travaux permettront d'améliorer la prise en charge des patients traités par ce protocole à haute dose de carboplatine et étoposide et, au-delà de cette indication thérapeutique, notre connaissance de ces deux médicaments cytotoxiques importants.

TITRE et RESUME en anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

MOTS-CLES : Suivi thérapeutique pharmacologique, carboplatine, etoposide, pharmacocinétique, pharmacogénétique, hautes doses

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Sciences de la vie et de la santé - Pharmacologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE : Equipe 14 Inserm UMR1037 CRCT - IUCT Oncopole – Laboratoire de Pharmacologie

Institut Universitaire du Cancer
1, avenue Irène Joliot-Curie
31059 Toulouse Cedex 9