



HAL
open science

Le cétuximab dans la prise en charge des cancers ORL. Impact de la pharmacocinétique sur l'efficacité

Emel Peker

► **To cite this version:**

Emel Peker. Le cétuximab dans la prise en charge des cancers ORL. Impact de la pharmacocinétique sur l'efficacité. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02130032

HAL Id: dumas-02130032

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02130032>

Submitted on 15 May 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.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTE DE
PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 3 MAI 2019

PAR

Mme Emel PEKER

Née le 17 Mai 1994 à FREJUS

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

LE CETUXIMAB DANS LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS ORL
IMPACT DE LA PHARMACOCINETIQUE SUR L'EFFICACITE

JURY :

Président : Dr Joseph CICCOLINI

Membres : Dr Bertrand POURROY

Dr Guillaume HACHE

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENTS BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES
TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES
TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES
TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE
PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION
PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

A.H.U

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

M. Charles DESMARCHELIER

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE

Mme Diane BRAGUER
M. Stéphane HONORÉ

PHARMACODYNAMIE

M. Benjamin GUILLET

TOXICOLOGIE GENERALE

M. Bruno LACARELLE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE

M. Guillaume HACHE
Mme Ahlem BOUHLEL
M. Philippe GARRIGUE

PHYSIOLOGIE

Mme Sylviane LORTET
Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL

TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE

M. Joseph CICCOLINI
Mme Raphaëlle FANCIULLINO
Mme Florence GATTACECCA

TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE

M. Pierre-Henri VILLARD
Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU
Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U

PHARMACIE CLINIQUE

M. Florian CORREARD

PHARMACOCINETIQUE

Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier tous les membres de mon jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse.

A mon président du jury et directeur de thèse, Mr Joseph CICCOLINI

Vous m'avez confié ce sujet et m'avez apporté l'aide dont j'avais besoin, ainsi que de nombreux conseils pour l'élaboration de ce travail et je vous en suis sincèrement reconnaissante. Vous avez su répondre à mes attentes, merci pour votre encadrement et votre soutien. Trouvez ici le témoignage de mon estime et de ma sympathie.

A l'ensemble du jury ; Mr Bertrand POURROY et Mr Guillaume HACHE

Je vous fais part de ma profonde gratitude pour votre participation à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression ma profonde reconnaissance.

A Clémence MARIN

Ton écoute et ton soutien m'ont été précieux. Tu as su me guider et me conseiller au mieux et pour cela je t'en remercie.

A mes parents, mon petit frère

Pour votre patience et votre soutien inconditionnel tout au long de mes études. Vous avez toujours su être présents pour moi, vous m'avez accompagné dans mon parcours, et vous avez su trouver les mots pour m'encourager, Merci. Et particulièrement à toi maman, c'est en grande partie grâce à toi si j'en suis arrivée là aujourd'hui.

D'abord à mes Cousines, mais aussi à toute ma famille, vous êtes nombreux mais vous avez tous une place à part pour moi. Merci pour votre soutien, vos encouragements et votre motivation.

Je salue Amélie, Gladys, Malia, Adèle, Dhwarifa sans oublier ma binôme préférée Estelle et les remercie pour tous ces moments partagés, les hauts comme les bas, au cours de ces années universitaires.

Merci à Mme JACQUET et Mme GUILLARD de m'avoir formé au sein de leur pharmacie, merci à Christine, Christelle, Sonia, Géralde, et Ariane. J'ai énormément appris grâce à vous toutes.

A toi mon frère Talip...

“L’UNIVERSITE N’ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION
AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS.”

LE CETUXIMAB DANS LA PRISE EN CHARGE
DES CANCERS ORL :
IMPACT DE LA PHARMACOCINETIQUE
SUR L'EFFICACITE

Sommaire

I.	INTRODUCTION.....	17
II.	LE CANCER.....	18
a.	Epidémiologie.....	18
b.	Plan cancer.....	19
c.	Cancérogenèse.....	20
III.	INNOVATION THERAPEUTIQUE.....	22
a.	Diagnostic moléculaire.....	22
b.	Plateforme de génétique moléculaire.....	25
c.	Médecine de précision.....	26
d.	Les thérapies ciblées.....	27
e.	Petite molécule : les inhibiteurs tyrosines kinases.....	29
f.	Anticorps monoclonaux.....	31
g.	Immunothérapie.....	34
IV.	PHARMACOCINETIQUE DES BIOTHERAPIES.....	37
a.	Principe de la pharmacocinétique.....	37
1.	Absorption.....	38
2.	Distribution.....	41
3.	Métabolisation.....	44
4.	Élimination.....	46
b.	Pharmacocinétique des biothérapies.....	48
1.	Principales différences pharmacocinétique des biothérapies.....	49
2.	Comment anticiper la pharmacocinétique des biothérapies malgré ces différences ?.....	52
V.	CETUXIMAB.....	55
a.	La voie EGF.....	55
b.	Statut KRAS.....	59
c.	Cétuximab une molécule bioguidée.....	61
VI.	EXPERIMENTATION.....	65
a.	Introduction.....	65
b.	Méthodes analytiques.....	66
1.	ELISA.....	66
2.	Matériels et méthodes.....	67
c.	Étude Pilote préliminaire.....	71
d.	Survie.....	73
VII.	CONCLUSION.....	80
VIII.	BIBLIOGRAPHIE.....	82

Table des figures

Figure 1 : Etape de la cancérogenèse¹

Figure 2 : Comparaison entre une cellule saine et une cellule tumorale²

Figure 3 : Les 28 plateformes de génétiques moléculaires des cancers³

Figure 4 : Les différents niveaux de blocage des thérapies ciblées⁴

Figure 5 : Mécanisme d'action des inhibiteurs des tyrosines kinases

Figure 6 : Structure d'un anticorps monoclonal⁵

Figure 7 : Anticorps monoclonaux : trois générations

Figure 8 : L'exemple des anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (nivolumab et pembrolizumab)⁴

Figure 9 : Les différentes étapes de la pharmacocinétique (système A-D-M-E)

Figure 10 : L'effet de premier passage⁶

Figure 11 : Relation entre la fraction libre du médicament et le nombre de site de fixation libre

Figure 12 : Processus d'élimination rénale

Figure 13 : Inconciliabilité des biothérapies avec le système A – D – M – E

Figure 14 : Evolution de la demi-vie des anticorps monoclonaux au cours du temps

Figure 15 : Stationnarité pharmacocinétique vs non stationnarité pharmacocinétique⁷

Figure 16 : Variations des concentrations sériques chez les patients traités par Cétuximab

Figure 17 : Représentation de la variabilité interindividuelle face à une population type

Figure 18 : Récepteur à activité tyrosine kinase transmembranaire⁸

Figure 19 : Voie MAP kinase et PI3 kinase⁹

Figure 20 : Forme active et inactive de la protéine RAS¹⁰

Figure 21 : Cascade suite à la mutation KRAS

Figure 22 : La chaîne chromatographie liquide¹¹

Figure 23 : Principe de la fragmentation des composés par un spectromètre de masse¹²

Figure 24 : Chromatogrammes de peptides HT4 (à gauche) et LT3 (à droite)

illustrant le signal dans des échantillons de plasma vierges (A), la limite inférieure de quantification (B) et chez un patient avant l'administration du cétuximab (concentration résiduelle) (C)¹³

Figure 25 : Protocole simplifié pour la préparation des échantillons avant l'analyse LC-MS / MS¹³

Figure 26 : Dispersion des concentrations de cétuximab après la fin de la perfusion (C_{max}, à droite) et immédiatement avant le début de la perfusion suivante¹³

Figure 27 : Des boîtes à moustaches comparant les niveaux d'exposition au cétuximab chez les patients en fonction du résultat clinique¹³

Figure 28 : Courbe de l'analyse ROC avec sensibilité à 86% et spécificité à 78%¹³

Figure 29 : Courbe Kaplan meier de la survie globale

Figure 30 : Courbe Kaplan meier de la survie sans progression

Liste des tableaux

Tableau 1 : Thérapie ciblée ayant une AMM en cancérologie

Tableau 2 : Différence pharmacocinétique entre les petites molécules et les biothérapies

Tableau 3 : Mécanisme d'action des inhibiteurs EGFR¹⁴

Liste des abréviations

ADC : Antibody Drug Conjugate
ADCC : Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Akt : Protein Kinase B
ALAT : Alanine aminotransférase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ASAT : Aspartate aminotransférase
ATP : Adénosine -TriPhosphate
CH : Centre Hospitalier
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
Cl : Clairance
CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer
C_{max} : Concentration maximale
C_{min} : Concentration minimale
CTCAE : Common Terminology Criteria for Averse Events
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen4
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
Fab : Fragment Antigen Binding
Fc : Fragment Crytallizable
fu : fraction libre
GAP : GPTase Activating Protein
GDP : Guanosine DiPhosphate
GTP : Guanosine TriPhosphate
GTPase : Guanosine TriPhoshatase
HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies
HER1 : Human Epidermal growth Receptor 1
Ig : Immunoglobuline
IMC : Indice de Masse Corporel
INCa : Institut National du Cancer
ITK : Inhibiteur Tyrosine Kinase
KDa : KiloDalton

LC : Chromatographie en phase Liquide
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MS : Spectrométrie de Masse
ORL : Oto-Rhino-Laryngologie
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD1 : Programmed Death 1
PD-L1 : Programmed Death Ligan 1
pH : Potentiel Hydrogène
Pi3K : Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase
RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
SH2 : Src Homology 2
SPE : Extraction en Phase Solide
TGF α : Transforming Growth Factor alpha
TMC : Thérapie Moléculaire ciblée
TMDD : Target Mediated Drug Disposition
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU : 5 -Fluoro-Uracil

I. INTRODUCTION

Le cancer est une priorité nationale en santé publique.

Avec 150 000 décès par an, le cancer est la première cause de décès en France.

On estime 400 000 nouveaux cas de cancer chaque année, des chiffres qui ont pratiquement doublé en 25 ans.

Bien que la survie nette à 5 ans ait augmenté entre 1989 - 2010, pour la majorité des localisations certains cancers restent de mauvais pronostic, notamment les cancers liés au tabac et/ou à l'alcool (poumon, œsophage, ORL...).

L'oncologie est l'un des domaines les plus porteurs en termes d'innovations.

L'enjeu principal est d'offrir aux patients cancéreux de meilleures chances de survie. Ainsi la recherche contre le cancer tente de mettre au point des techniques innovantes et des thérapies individualisées avec une médecine de précision qui traitent les effets de l'altération génétique propre à la tumeur du patient.

La tendance actuelle des objectifs, porte essentiellement sur la prévention, le dépistage, la compréhension des mécanismes de la cancérogenèse, le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, l'amélioration de la qualité de vie des patients, ainsi que le développement de marqueurs diagnostiques, pronostiques, ou encore prédictifs de réponse aux traitements.

Dans une première partie nous aborderons brièvement la notion de cancer et de cancérogenèse.

Dans une seconde partie nous reviendrons sur la question d'innovation thérapeutique, l'intérêt du diagnostic moléculaire et en quoi cette nouvelle approche permet-elle un meilleur guidage thérapeutique dans une médecine de précision où les thérapies ciblées sont les acteurs clés.

Puis nous rappellerons le rôle majeur du suivi pharmacocinétique non seulement dans les traitements chroniques mais tout particulièrement dans le domaine de l'oncologie au cours d'une thérapie basée sur l'administration d'anticorps monoclonaux.

Enfin, les dernières parties seront axées sur l'intérêt du cétuximab dans les cancers ORL, anticorps monoclonal également indiqué dans les cancers colorectaux.

II. LE CANCER

a. Epidémiologie

En 2017, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine est estimé à 400 000 : près de 54 % chez l'homme, soit environ 214 000 cas et 46 % chez la femme, soit 186 000 cas. Les cancers les plus fréquents sont le cancer de la prostate, du poumon et du colon-rectum chez l'homme et chez la femme le cancer du sein, du colon-rectum et du poumon.

Le nombre de décès par cancer est estimé à environ 150 000 pour l'année 2017 : 56 % chez l'homme, soit 84 000 décès et 44 % chez la femme, soit 66 000 décès.

Chez l'homme, le cancer du poumon reste de loin le cancer le plus meurtrier, devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate.

Chez la femme, le cancer du sein se situe en tête de la mortalité ; le cancer du poumon arrive juste après et le cancer colorectal se situe en troisième position¹⁵.

b. Plan cancer

Depuis 2003, la lutte contre le cancer en France est structurée autour de plans nationaux visant à mobiliser tous les acteurs autour de la prévention, du dépistage, des soins de la recherche et de l'accompagnement du patient et de ses proches.

Les critères de qualité définissant le standard minimum de qualité dans la prise en charge ont été établis, les établissements de santé devant satisfaire à ces critères pour être autorisés à traiter des malades atteints de cancer (en chirurgie, en radiothérapie et en chimiothérapie).

Le premier plan cancer lancé par le président de la République a permis d'instaurer une dynamique décisive dans la lutte contre le cancer. Il s'étale de mars 2003 à 2007. Grâce à lui la consommation de tabac a diminué, le programme de dépistage du cancer du sein a été généralisé en 2004.

Le second 2009-2013, s'est engagé dans des voies nouvelles pour soutenir les innovations thérapeutiques, et faire progresser la recherche afin d'assurer une continuité des parcours des patients. Des programmes personnalisés de soins et de l'après cancer ont été expérimentés d'autre part.

Le 3^{ème} Plan cancer 2014-2019 a pour inspiration première de répondre aux besoins et aux attentes des personnes malades, de leurs proches et de l'ensemble des citoyens. Il comprend 17 objectifs regroupés autour de trois grandes priorités de santé ¹⁶ :

- ✓ guérir et accompagner la personne et ses proches
- ✓ préserver la continuité et la qualité de vie
- ✓ investir dans la recherche et la prévention.

Le plan cancer s'inscrit dans la mise en œuvre d'une stratégie nationale de santé et de l'Agenda stratégique pour la recherche, le transfert et l'innovation « France Europe 2020 ».

c. Cancérogenèse

La cancérogenèse est un phénomène très rarement héréditaire et seulement 10% des cas résulte d'une forme familiale. Ainsi dans près de 90% des cas, la cancérogenèse est un processus acquis. Il s'agit de la succession d'événements moléculaires au niveau de l'ADN engendrant une accumulation d'anomalie au niveau des cellules les transformant ainsi en cellules cancéreuses.

La survenue de ces mutations au niveau des gènes impliqués dans la cancérogenèse peut toucher un oncogène, responsable alors d'un gain de fonction mais peut également toucher des gènes suppresseurs de tumeurs occasionnant une perte de fonction. De plus les gènes réparateurs de l'ADN sont très souvent altérés.

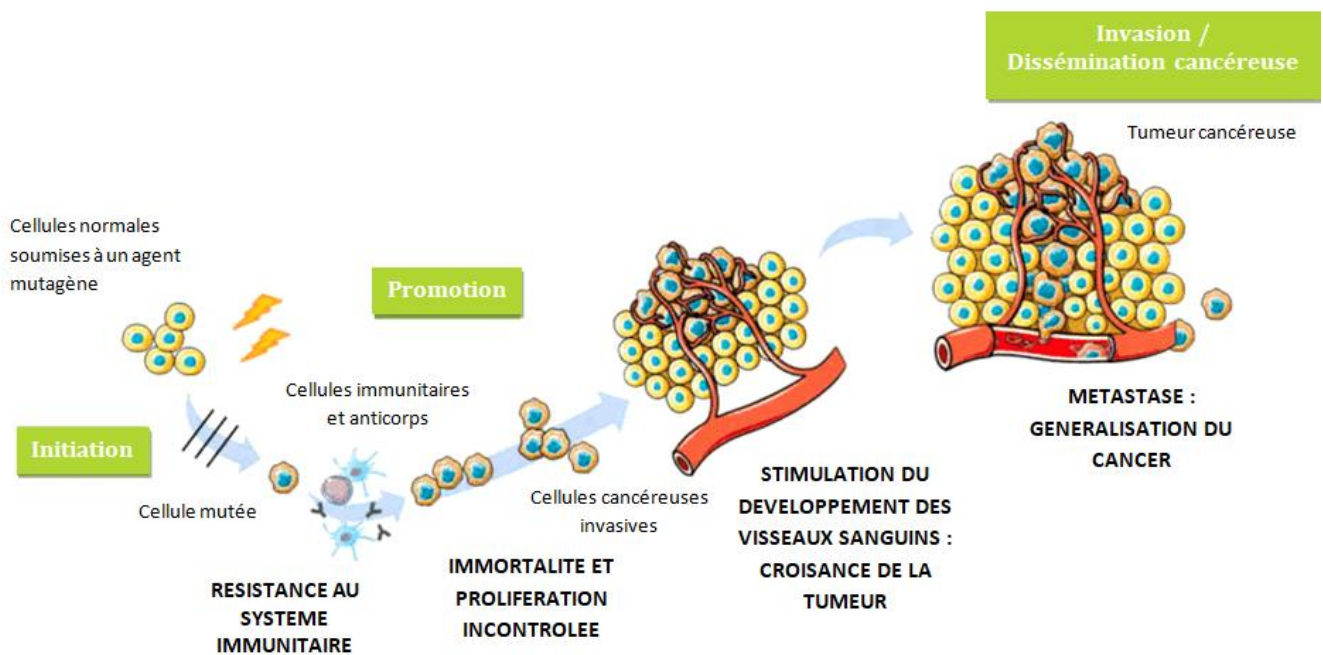


Figure 1 : Etape de la cancérogenèse¹

Une cellule normale, suite à des mutations spontanées ou causées par des facteurs extérieurs tel que certains composés chimiques, les rayons X ou encore des virus va devenir anormale soit une cellule initiée (mutée). Puis les anomalies de l'ADN vont s'accumuler et être responsable de lésions précancéreuses et de l'acquisition de **nouvelles fonctions** comme celle de la résistance au système immunitaire. Et une fois que les vaisseaux se forment et s'organisent au sein de ces lésions précancéreuses celles-ci acquièrent l'indépendance de croissance, on parle alors de véritable tumeur maligne.

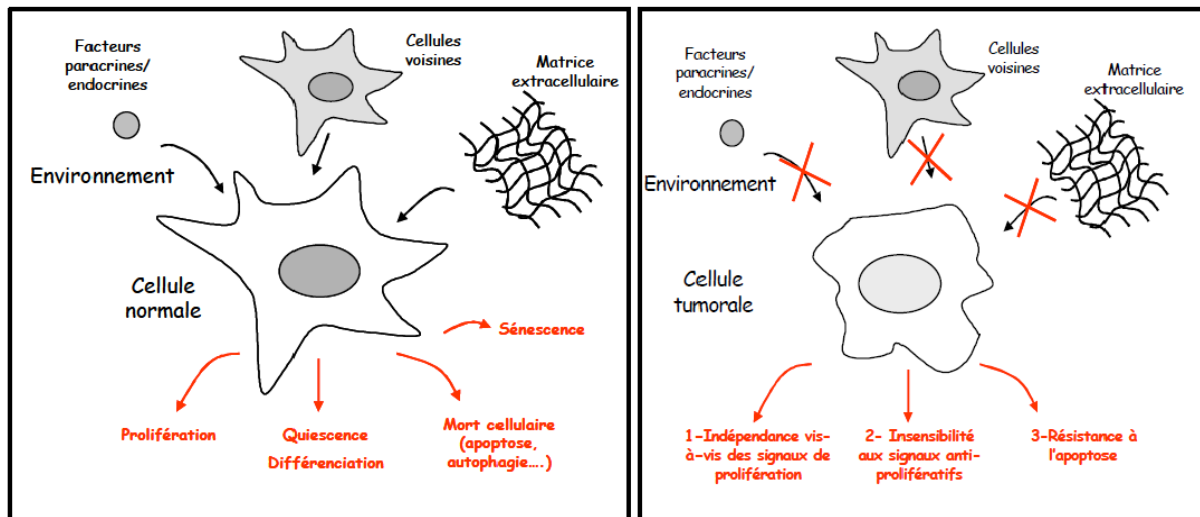


Figure 2 : Comparaison entre une cellule saine et une cellule tumorale²

La cancérogenèse se décrit par l'acquisition de nombreuses propriétés cellulaires:

- ✓ **Indépendance** : la croissance cellulaire ne résulte plus d'une réponse aux facteurs de croissance
- ✓ **Immortelle** avec un nombre de division illimité : en opposition aux cellules saines
- ✓ Capacité d'**échappement à l'apoptose**
- ✓ Capacité d'échappement au **système immunitaire**
- ✓ Capacité d'**invasion** et d'infiltration des tissus environnants ou distants
- ✓ Capacité à induire la **néo-angiogenèse** (processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins). Ces vaisseaux sont nécessaires afin d'apporter de l'oxygène et des nutriments à la tumeur pour sa croissance exponentielle.

Par ailleurs, l'auto-aggravation du cancer peut être causée par certaines capacités dites facilitantes :

⇒ **L'instabilité génétique** : l'accumulation d'anomalie de façon exponentielle et ainsi de modification à la fois morphologique et fonctionnelle de la cellule peut être source de résistance au traitement notamment pour les thérapies ciblées.

⇒ **Induction à l'inflammation** : génère un environnement favorable à la progression et la résistance au traitement de la cellule cancéreuse.

III. INNOVATION THERAPEUTIQUE

Dans le fondement, et dans tous les domaines de la santé, une thérapie est administrée en vue d'atteindre une cible. Toutefois, les « *thérapies ciblées* » évoquées dans la suite de cette thèse font référence aux thérapies anticancéreuses qui ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses. Il ne s'agit plus de thérapie visant toutes les cellules à renouvellement rapide, comme pour les chimiothérapies anticancéreuses classiques.

a. Diagnostic moléculaire

Le cancer est une maladie de l'ADN conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée en rapport avec l'accumulation d'altérations génétiques. Chaque patient est atteint d'un cancer « unique » et possède des altérations génétiques qui lui sont propres. Les modifications génomiques responsables de l'oncogenèse peuvent provenir d'un gène, soit d'une portion entière de chromosome. Ainsi la thérapie ciblée, va directement cibler les acteurs du mécanisme de l'oncogenèse.

La réalisation d'un **diagnostic moléculaire** mettant en avant les cibles spécifiques du cancer permet de vérifier l'éligibilité du patient à une thérapie ciblée. Par ailleurs l'étude du transcriptome des tumeurs est une technique qui permet de mesurer simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes. Celle-ci ouvre aussi de nouvelles perspectives, celles d'envisager un **traitement personnalisé** pour chaque patient¹⁷.

Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis la classification des tumeurs, en mettant en évidence que l'apparente homogénéité anatomopathologique des différents types histologiques tumoraux cachait en réalité une forte **hétérogénéité moléculaire**. De nouvelles signatures moléculaires ont ainsi été publiées et certaines se sont focalisées sur le pronostic des patients. Ces biomarqueurs pronostiques sont venus compléter les classifications histopronostiques déjà existantes et les nomenclatures utilisées en pratique oncologique courante.

De même, la caractérisation des principales voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse et des altérations génétiques fréquentes (mutations germinales et somatiques, réarrangement de type amplifications, translocations, modification de l'expression génique) au sein des cellules tumorales ont permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques avec la mise au point de molécules dirigées contre des cibles moléculaires particulières.

L'objectif étant de proposer des **combinaisons de thérapie ciblée** avec un rapport efficacité/toxicité favorable. Ces thérapies ciblées ont pour but d'interférer de façon spécifique avec une voie de signalisation intracellulaire anormalement activée ou un processus biologique favorisant la croissance et la dissémination tumorale, afin de les bloquer. Elles ont ainsi élargi l'arsenal des chimiothérapies disponibles et ont donné de nouveaux espoirs dans le traitement de tumeurs jugées jusqu'à présent de très mauvais pronostic¹⁸.

En effet, les connaissances dans la biologie du cancer en général ont conduit à un « **démembrement biologique** » de cette maladie. L'idée est de mettre en évidence, pour chaque tumeur, pour chaque patient et éventuellement à chaque étape de la maladie, le mécanisme biologique responsable de celle-ci en réalisant un prélèvement directement sur la tumeur et en l'analysant sur l'une des 28 plateformes labellisées par l'INCa.

Ainsi, par exemple, les patients présentant une tumeur avec une mutation activatrice de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) sont éligibles à un inhibiteur de l'EGFR avec des taux de réponses et une survie sans progression doublés par rapport à la chimiothérapie standard, même si celle-ci garde une place de choix. Ainsi, de plus en plus de couples biomarqueur/traitement ciblés, deviennent disponibles et bientôt on l'espère dans chaque situation (tous types histologiques, traitement initial, traitement de rechute)¹⁹.

Les techniques de biologie moléculaire utilisées dans le diagnostic des maladies, incluent des techniques telles que l'hybridation *in situ* de chromosomes pour les analyses cytogénétiques, le séquençage par oligonucléotides en batterie de modèles d'expression géniques aux différentes étapes de la maladie, l'identification d'organismes pathogènes par l'analyse de séquences spécifiques d'ADN, et la détection de mutations avec PCR (polymerase chain reaction)¹⁷.

Le diagnostic moléculaire permet ainsi d'étudier le génome de la tumeur afin de connaître plus précisément la nature du cancer et de le traiter plus efficacement. Ce diagnostic est personnalisé afin d'améliorer la prise en charge des patients et permet l'obtention une « carte d'identité de la tumeur »²⁰.

La grande majorité des études entreprises pour déterminer une nouvelle cible pertinente ont pour objectif commun de développer de nouvelles entités chimiques à visée thérapeutique. Malgré l'évaluation des propriétés physico-chimiques *in vitro* et *in silico* ayant pour but d'améliorer l'attraction des composés avec leur cible, il n'est pas simple de garantir des candidats médicaments avec un bon profil pharmacocinétique et un faible risque d'*in vivo* toxicité. C'est ce que l'on appelle la « druggability »²¹.

Enfin, le développement par l'INCa d'un programme volontariste portant sur des biomarqueurs émergents et des stratégies innovantes, permet à la France et à ses malades d'accéder précocement, dans le cadre d'essais cliniques en particulier, aux nouveaux médicaments développés partout dans le monde. L'accélération de la mise à disposition des nouvelles molécules, la possibilité pour chaque patient d'accéder à un essai clinique pertinent dans le cadre de sa maladie doit être une priorité pour chaque institution et chaque clinicien.

b. Plateforme de génétique moléculaire

Pour soutenir le développement des thérapies ciblées et faciliter leur accès aux patients qui peuvent en bénéficier, l'institut national du cancer (INCa) a mis en place des plateformes de génétique moléculaire des cancers. Les plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers ont pour vocation de réaliser des tests moléculaires innovants pour l'ensemble des patients de la région, quel que soit l'établissement où ils sont pris en charge : CHU, CLCC, CH, établissements privés.

L'objectif est d'organiser un maillage territorial suffisant pour que les prélèvements tumoraux parvenant dans les laboratoires habituels d'anatomopathologie ou d'hématocytologie puissent être pris en charge rapidement dans une plateforme avec laquelle il existe des liens organisés¹⁸.

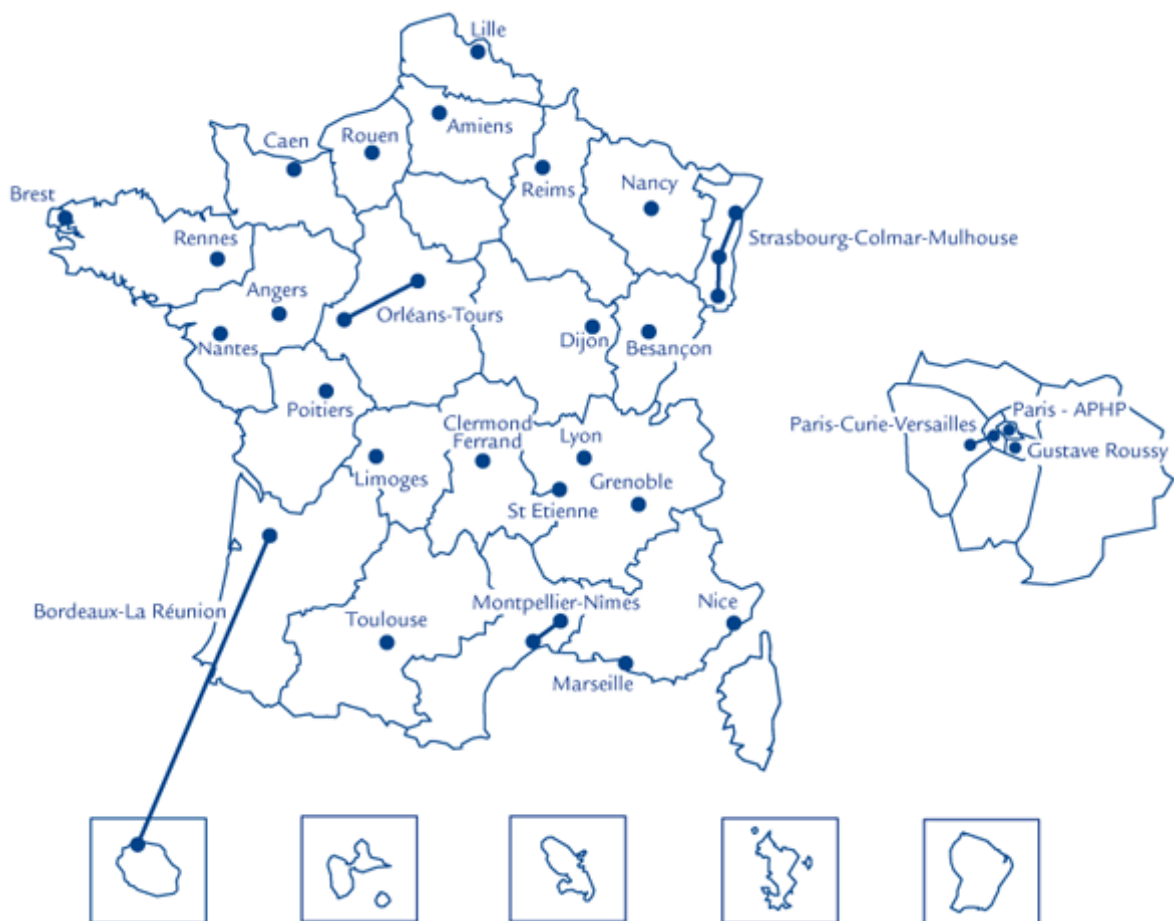


Figure 3 : Les 28 plateformes de génétiques moléculaires des cancers³

Actuellement, 30 thérapies ciblées sont associées à un biomarqueur moléculaire. L'analyse des biomarqueurs de génétique somatique est aujourd'hui indispensable pour le diagnostic, la classification, le choix et la surveillance du traitement d'un nombre croissant de cancers. Ainsi les plateformes réalisent les tests moléculaires :

- ✓ Déterminant l'accès à une thérapie ciblée ;
- ✓ Orientant le processus diagnostique ;
- ✓ Participant au diagnostic en complémentarité de paramètres cliniques, morphologiques, biologiques ;
- ✓ Orientant la stratégie de traitement du patient ;
- ✓ Permettant le suivi de la maladie résiduelle.

c. Médecine de précision

On sait aujourd'hui qu'il n'existe pas un cancer par organe, mais une multitude de sous-types de cancers présentant chacun des anomalies particulières au sein des cellules cancéreuses et de leur environnement. Les traitements de médecine de précision, également appelée **médecine personnalisée** visent à bloquer ou corriger ces perturbations en ciblant les anomalies moléculaires qui en sont responsables. **La médecine de précision a ainsi pour objectif de proposer au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur.** Aujourd'hui, la médecine de précision permet :

- ✓ de développer de nouveaux traitements ciblant précisément des mécanismes biologiques jouant un rôle majeur dans le développement des tumeurs ;
- ✓ d'identifier des groupes de patients dont les tumeurs présentent des anomalies moléculaires communes susceptibles d'être ciblées par des traitements spécifiques.

Elle repose actuellement sur deux types de traitements, **les thérapies ciblées** et **l'immunothérapie spécifique**. Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Les traitements d'immunothérapie spécifique, quant à eux, ne vise pas directement la tumeur mais tentent de restaurer l'efficacité du système immunitaire, afin qu'il attaque les cellules cancéreuses qui jusqu'alors n'étaient plus reconnaissables par celui-ci.

La médecine de précision fait aujourd'hui partie des soins disponibles contre le cancer. Elle ne remplace pas les traitements déjà en place, qui permettent actuellement de guérir un cancer sur deux, mais elle vient compléter l'arsenal thérapeutique existant. La médecine de précision offre ainsi de nouvelles possibilités pour les patients présentant des cancers contre lesquels les traitements « classiques » ne sont pas suffisants²¹.

d. Les thérapies ciblées

Depuis quelques années, on assiste à une émergence de molécules utilisées dans la prise en charge des patients atteints de cancer. Les chimiothérapies conventionnelles avec des effets indésirables graves sont de moins en moins préconisées au profit de nouveaux traitements appelés « thérapies ciblées » ou plus exactement « **thérapies moléculaires ciblées** » (TMC), mieux tolérées, et plus spécifiques des cellules cancéreuses.

Ainsi depuis une trentaine d'année, on ne parle plus de traitement « du cancer » mais de traitements « d'un cancer » sous entendu plus spécifique. Grâce aux progrès de la pharmacologie qui permet l'instauration de traitement à la carte en fonction du type de cancer et du patient.

Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Certaines thérapies ciblées sont capables de s'attaquer précisément à ces perturbations.

Leur action consiste à bloquer la transmission de certaines informations au sein des cellules qui les conduisent à se diviser et à proliférer de façon anarchique⁴.

Les thérapies ciblées peuvent agir à différents niveaux de la cellule :

- ✓ sur les facteurs de croissance (qui sont des messagers déclenchant la transmission d'informations au sein d'une cellule),
- ✓ sur leurs récepteurs transmembranaires (qui permettent le transfert de l'information à l'intérieur de la cellule)
- ✓ sur des éléments impliqués dans les voies de signalisation à l'intérieur des cellules.

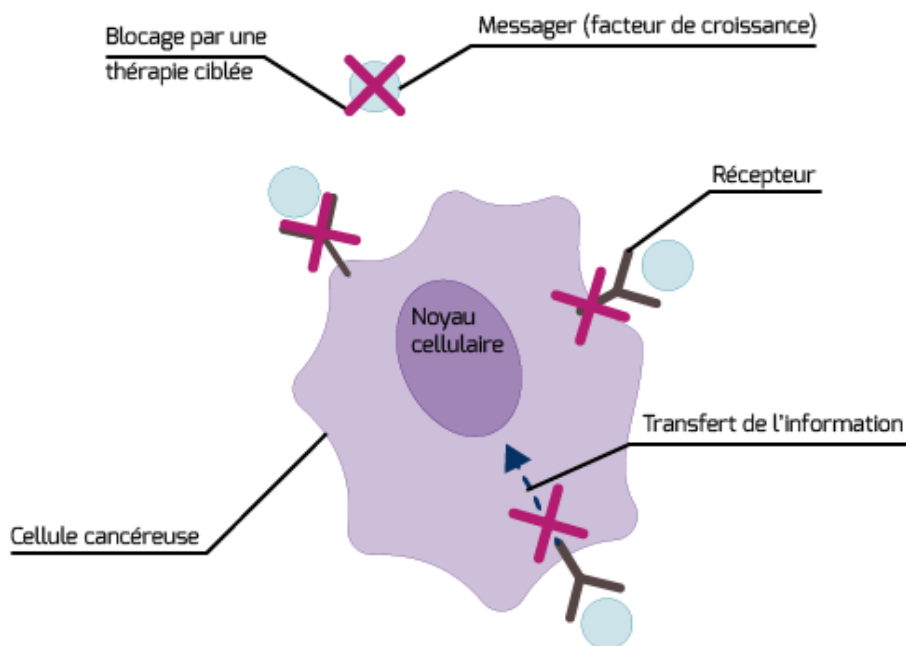


Figure 4 : Les différents niveaux de blocage des thérapies ciblées⁴

Il existe deux grands groupes de thérapies ciblées :

- ⇒ **Les petites molécules** qui interfèrent avec des cibles intracellulaires (récepteurs aux tyrosines kinases, voies de signalisation)
- ⇒ **Les anticorps monoclonaux** qui interfèrent avec des cibles membranaires ou extracellulaires.

e. Petite molécule : les inhibiteurs tyrosines kinases

Plus de 100 facteurs de croissance et 58 récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ont été identifiés et nombre d'entre eux peuvent être impliqués dans l'oncogenèse. L'activation de ces RTK se fait selon un schéma général de fonctionnement unique ; fixation d'un ligand au niveau du site de liaison extracellulaire, dimérisation puis autophosphorylation des récepteurs, grâce à leur activité tyrosine kinase, qui constitue le point de départ de la voie de signalisation. Les voies de signalisation en aval de l'interaction facteur de croissance- RTK sont multiples et dépendent du « contexte cellulaire » c'est-à-dire de la disponibilité des protéines qui sont activées en réponse à la phosphorylation du récepteur²³.

Les inhibiteurs de tyrosines kinases sont des molécules qui se fixent de façon **compétitive** au niveau du site de fixation de l'ATP du domaine catalytique intra-cytosolique des tyrosines kinases grâce à leur faible masse moléculaire et leur propriété amphiphile. Dans leur grande majorité, les inhibiteurs de tyrosine kinase sont administrés par voie orale, pourvus d'un profil de toxicité très favorable, et peuvent être associés avec d'autres formes de chimiothérapie ou avec la radiothérapie, ou encore entre eux.

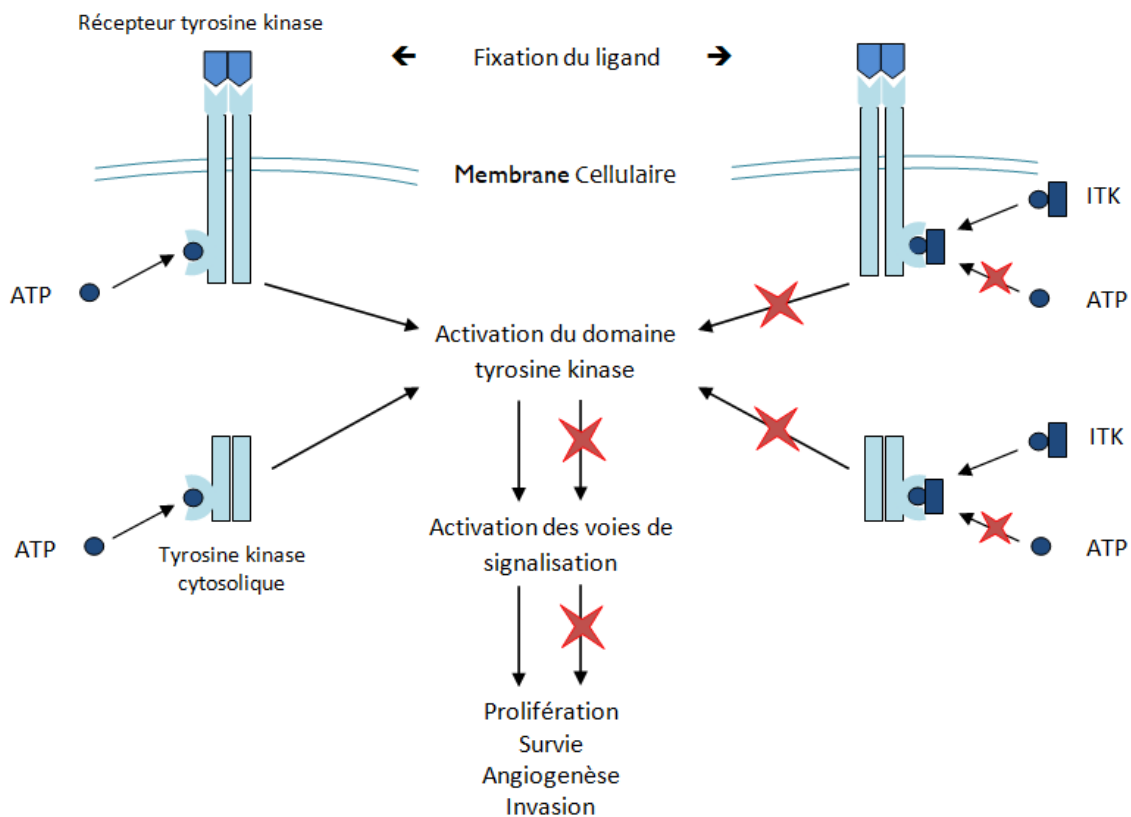


Figure 5 : Mécanisme d'action des inhibiteurs des tyrosines kinases

Les tyrosines kinases sont des enzymes, qu'il s'agisse de récepteurs ou non, ils jouent un rôle majeur dans la **signalisation cellulaire** en aval des facteurs de croissance. Les tyrosines kinases assurent le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers une protéine effectrice impliquée dans de nombreux processus de régulation cellulaire. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires impliquées dans la transduction intra-cytoplasmique du signal émanant du niveau extracellulaire. À l'intérieur de la cellule, d'autres protéines tyrosine kinases jouent également un rôle essentiel dans la transduction du signal.

L'activation de ces protéines, récepteurs ou protéines intracellulaires, permet d'induire la prolifération et la croissance cellulaire tumorale, de réprimer l'apoptose, et de promouvoir l'angiogenèse et la diffusion métastatique.

Parallèlement à l'activation de ces enzymes par l'intermédiaire de facteurs de croissance, l'auto-activation des tyrosine kinases liées à l'acquisition d'anomalies génétiques au cours de l'oncogenèse est un phénomène fréquemment observé. Les inhibiteurs de tyrosine kinase se fixent de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP grâce à leur analogie structurale avec celle-ci et bloquent ainsi l'activation des sites tyrosine kinase. Par conséquent, la signalisation cellulaire en aval est interrompue, rétablissant ainsi le contrôle de la prolifération de la survie cellulaire. Dans les tumeurs solides, les inhibiteurs de tyrosine kinase induisent également une inhibition de l'angiogenèse et de la diffusion métastatique.

Le Glivec®, Imatinib est de loin l'un des meilleurs exemples du succès de ces nouvelles thérapies. L'Imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase, de la protéine BCR-ABL, qui anormalement active est caractéristique de la leucémie myéloïde chronique. Grâce à lui la survie à 2 ans est passée de près de 25 % à plus de 70 %²⁴.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase représentent par conséquent une classe florissante de molécules permettant de proposer de nouvelles options thérapeutiques spécifiques. Cependant, leur utilisation n'apparaît pas sans limite, et l'apparition de résistances ou encore l'absence de réponse thérapeutique en dépit de l'expression avérée de la cible moléculaire pose la question de l'optimisation des **critères de prescription**. Dans ce contexte, seule la mise en évidence et la validation de nouveaux critères de diagnostic moléculaire dans des programmes de recherche translationnelle permettront de lever ces problèmes²⁵.

f. Anticorps monoclonaux

La découverte par Köhler et Milstein en 1975 de la technique des hybridomes a permis la sélection et la production en quantité quasi illimitée d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre une cible unique. Dans les premiers temps de leur utilisation, leur efficacité était faible voire décevante dû essentiellement à la nature même des anticorps utilisés. Les premiers anticorps monoclonaux mis au point étaient murins. Cependant leur nature murine favorisait leur élimination prématurée par l'organisme humain. Toutefois les progrès biotechnologiques et la recherche dans le domaine de l'immunociblage a permis une amélioration sans conteste de l'efficacité des anticorps monoclonaux²⁶.

Ces anticorps monoclonaux sont des molécules **bifonctionnelles** de 150 kDa, actifs soit directement par leur activité intrinsèque soit indirectement en induisant une réponse immunitaire de type ADCC (Antibody – Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) ou en activant la cascade du complément. Des propriétés additionnelles peuvent leur être conférées par couplage avec des molécules cytotoxiques « conventionnelles » ou des radio-isotopes ; dans ce cas, l'anticorps semble essentiellement jouer le rôle de vecteur conduisant l'agent médicamenteux associé vers sa cible. Il s'agit des **ADC** (Antibody-Drug Conjugates) associant les avantages d'un traitement ciblé à une chimiothérapie puissante, permettant une thérapie sélective avec un index thérapeutique plus élevé.

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) ont pour fonction première de se lier spécifiquement à un antigène, l'autre est de recruter d'autres cellules ou molécules pour détruire le pathogène à laquelle ils se sont liés. Ces fonctions peuvent être exercées par un même anticorps grâce à ses différentes parties. Une première partie identique chez toutes les immunoglobulines de même isotype appelée fragment Fc (ou région constante) conférant une fonction effectrice, des propriétés biologiques et la capacité de fixer le complément. Et une autre partie appelée fragment Fab (ou région variable où l'on retrouve des régions hypervariables). C'est dans ces régions variables de l'anticorps que se trouve le paratope. Le paratope permet la liaison à l'épitope d'une cible, qui lui détermine l'appartenance au domaine du soi, c'est le déterminant antigénique d'une molécule²⁶.

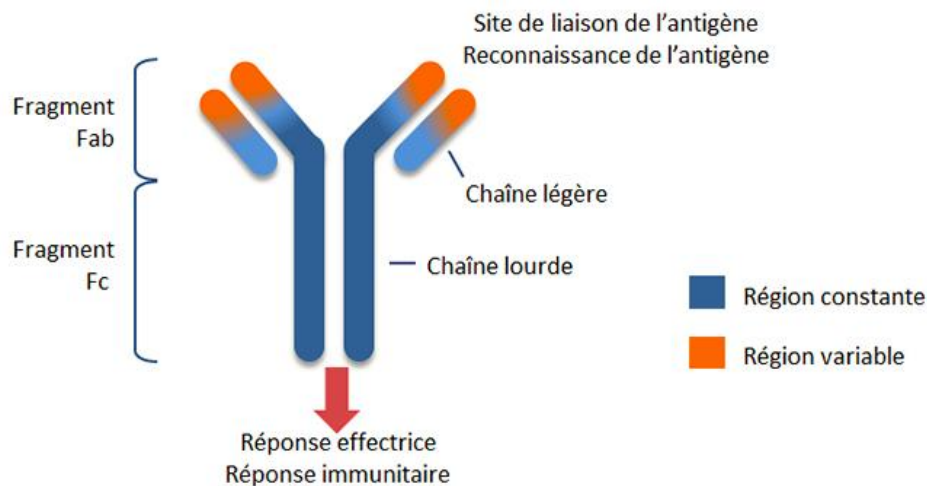


Figure 6 : Structure d'un anticorps monoclonal⁵

Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient entièrement murins, issus de la technique d'hybridation lymphocytaire développée par Köhler et Milstein.

L'utilisation de ces anticorps chez l'homme est limitée par l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre ces protéines étrangères connues sous le nom de HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies). Afin de rendre ces premiers anticorps moins immunogène, faciliter leur accès et ainsi la pénétration à la tumeur il était indispensable de modifier la structure pour en améliorer l'efficacité thérapeutique.

L'optimisation de ces anticorps monoclonaux s'est concrétisée en diminuant de façon progressive la partie murine de leur structure : les anticorps monoclonaux murins sont ainsi devenus chimériques puis humanisés et enfin totalement humains ; améliorant ainsi leur sélectivité, leur spécificité et leurs propriétés pharmacocinétiques, tout en **diminuant leur immunogénicité**. La nomenclature a suivi cette évolution avec l'adoption, dans les dénominations communes internationales ; les suffixes « -momab » déterminent les anticorps murins, « -ximab » pour les anticorps chimériques, « -zumab » les anticorps humanisés et enfin « -mumab » pour les anticorps totalement humains^{27 28}.

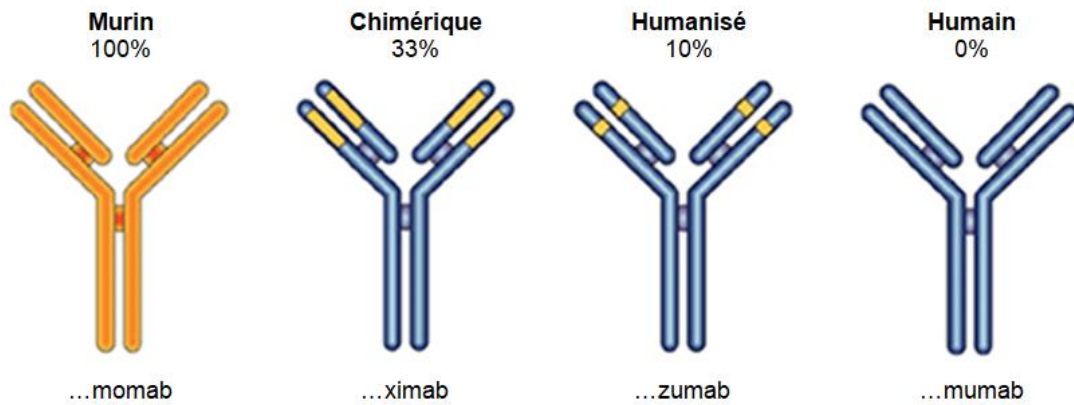


Figure 7 : Anticorps monoclonaux : trois générations

Dans un premier temps, des anticorps dits chimériques ont été mis au point. Ils sont constitués de domaines variables murins et de domaines constants humains. Ces anticorps possèdent donc une partie non négligeable de protéines murines (33%) et une affinité pour l'antigène identique à l'anticorps parental.

Une nouvelle avancée a été réalisée avec l'ingénierie des anticorps humanisés ne conservant que les régions hypervariables de l'anticorps murin responsables de la spécificité et de l'interaction aux antigènes. Dans ce cas l'anticorps ne possède que 10% de protéines murines. Il est donc moins immunogène.

Finalement des anticorps totalement humains ont été produits en utilisant deux techniques différentes, celle du **Phage display** (basée sur la construction d'une collection d'ADN complémentaire qui combine les régions variables des chaînes légères et lourdes à partir des lymphocytes B) et celle des **souris transgéniques**²⁷.

Nom commercial	Substance active	Indication ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché					
		Ascite maligne	Cancers solides divers	Lymphome folliculaire lymphome non hodkinien à cellules B CD20+	Lymphome hodgkinien lymphome anaplasique à grandes cellules	LAL	LLC
AVASTIN	Bévacizumab		+				
REMOVAB	Catumaxomab	+					
ERBITUX	Cétuximab		+				
YERVOY	Ipilimumab		+				
OPDIVO	Nivolumab		+		+		
VECTIBIX	Panitumumab		+				
PERJETA	Pertuzumab		+				
CYRAMZA	Ramucirumab		+				
HERCEPTIN	Trastuzumab		+				
BLINCYTO	Blinatumomab					+	
ADCETRIS	Brentuximab				+		
ZEVALIN	Ibritumomab			+			
ARZERRA	Ofatumumab						+
MAB THERA	Rituximab*			+			+

Autre indications: * polyarthrite rhumatoïde

Tableau 1 : Thérapie ciblée ayant une AMM en cancérologie

g. Immunothérapie

En théorie les cellules cancéreuses, de par leur nature étrangère devraient être détectées, identifiées, attaquées pour enfin être éliminées par les défenses immunitaires. Cependant les cellules tumorales ont la capacité d'affaiblir l'activité anticancéreuse du système immunitaire. L'immunothérapie quant à elle regroupe l'ensemble des thérapeutiques utilisant le système immunitaire. Ainsi elle va tenter de restaurer la capacité d'action des défenses immunitaires du patient contre sa maladie, autrement dit contre les cellules cancéreuses.

Pour cela elle peut soit :

- ⇒ Se servir du système immunitaire, c'est-à-dire se servir d'un procédé immunologique comme d'un outil thérapeutique
- ⇒ Agir sur le système immunitaire afin de moduler ou influencer son fonctionnement

L'immunothérapie est ainsi utilisée dans différents cas de figure en fonction de la pathologie traitée (greffe d'organe – cancer).

Elle peut déprimer le système immunitaire on parle alors d'**immunosuppression** ; ou bien augmenter son efficacité il s'agit alors d'**immunostimulation** ; toutefois elle peut également influencer finement son fonctionnement c'est de l'**immunomodulation**.

Dans de nombreux cancers, les cellules tumorales parviennent à détourner les dispositifs du système immunitaire pour ne pas être reconnues comme cellules étrangères ou anormales et ainsi ne pas être attaquées et détruites par celui-ci. Pour cela, la tumeur déclenche des mécanismes très précis qui inactivent les cellules immunitaires et plus particulièrement les **lymphocytes T**. L'organisme ne peut pas alors fournir une réponse adaptée pour lutter contre les cellules cancéreuses. On dit que la tumeur « freine » le système immunitaire. Les mécanismes de défense de l'organisme sont alors incapables de cibler ces cellules tumorales qui peuvent ainsi proliférer.

Des traitements d'immunothérapie spécifiques ont été développés pour rétablir une réponse immunitaire adaptée. Ils agissent sur des cibles particulières de la tumeur ou de son environnement. Afin de permettre au système immunitaire de détruire les cellules cancéreuses plusieurs alternatives sont possibles ; les anticorps monoclonaux, notamment les « checkpoint kinase inhibitors » (les inhibiteurs de points de contrôle) qui sont le plus couramment utilisés, le transfert adoptif de cellules ou encore la vaccination anti-tumorale.

Les protéines dites « checkpoint » tels que CTLA-4, PD-1, sont des récepteurs exprimés à la surface des cellules immunitaires comme les lymphocytes T. Les cellules tumorales peuvent quant à elles présenter au niveau de leur membrane des protéines PD-L1 (ligand du récepteur PD-1). Si la protéine PD-L1 se lie au récepteur PD-1 du lymphocyte T, cela entraîne l'inactivation de la cellule immunitaire.

Par conséquent, bloquer ces checkpoints avec des Checkpoint Kinase Inhibitors réactive le système immunitaire. Ainsi les lymphocytes T vont pouvoir de nouveau reconnaître et lutter plus efficacement contre les cellules tumorales²⁶.

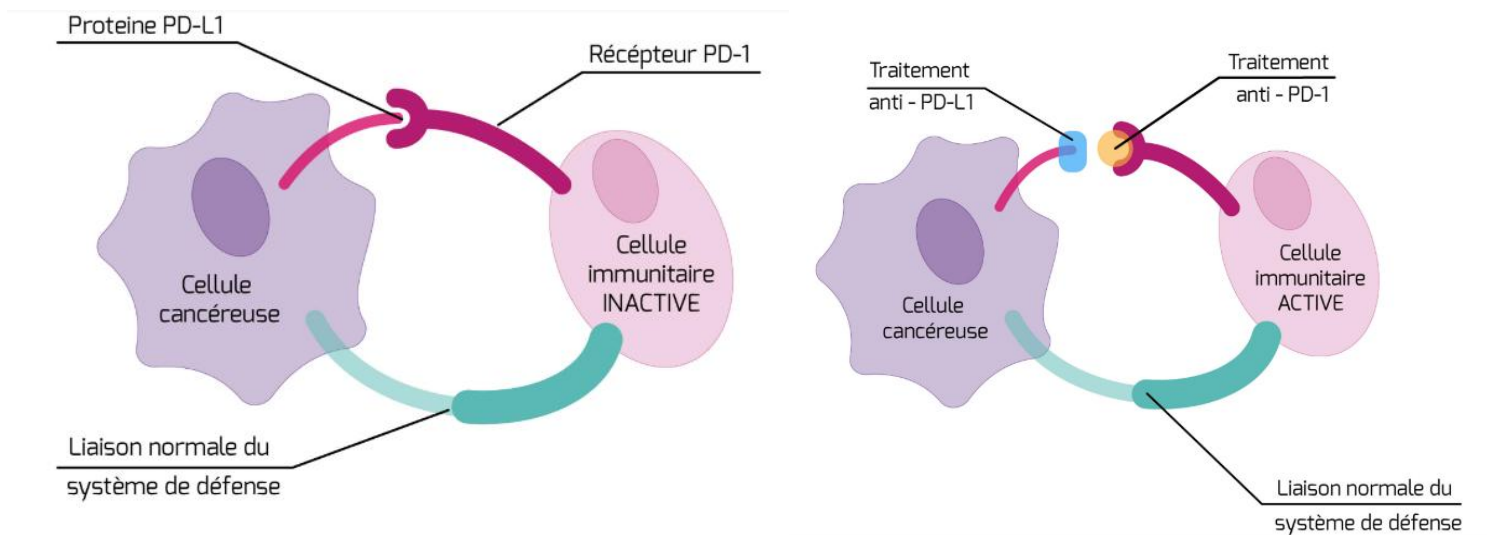
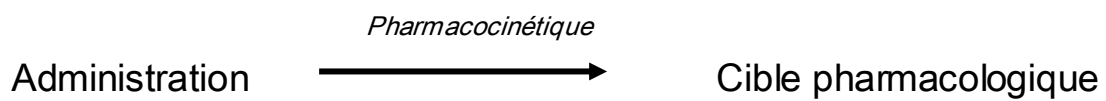


Figure 8 : L'exemple des anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (nivolumab et pembrolizumab)²⁶

IV. PHARMACOCINETIQUE DES BIOTHERAPIES

a. Principe de la pharmacocinétique

La pharmacocinétique est par définition l'étude descriptive et quantitative du devenir d'un principe actif au sein de l'organisme. Soit l'étude du « devenir du médicament » dans l'organisme.



La pharmacocinétique est constituée de 4 grandes étapes qui peuvent être concomitantes :

Le système A-D-M-E

- ✓ Absorption
- ✓ Distribution
- ✓ Métabolisation
- ✓ Elimination

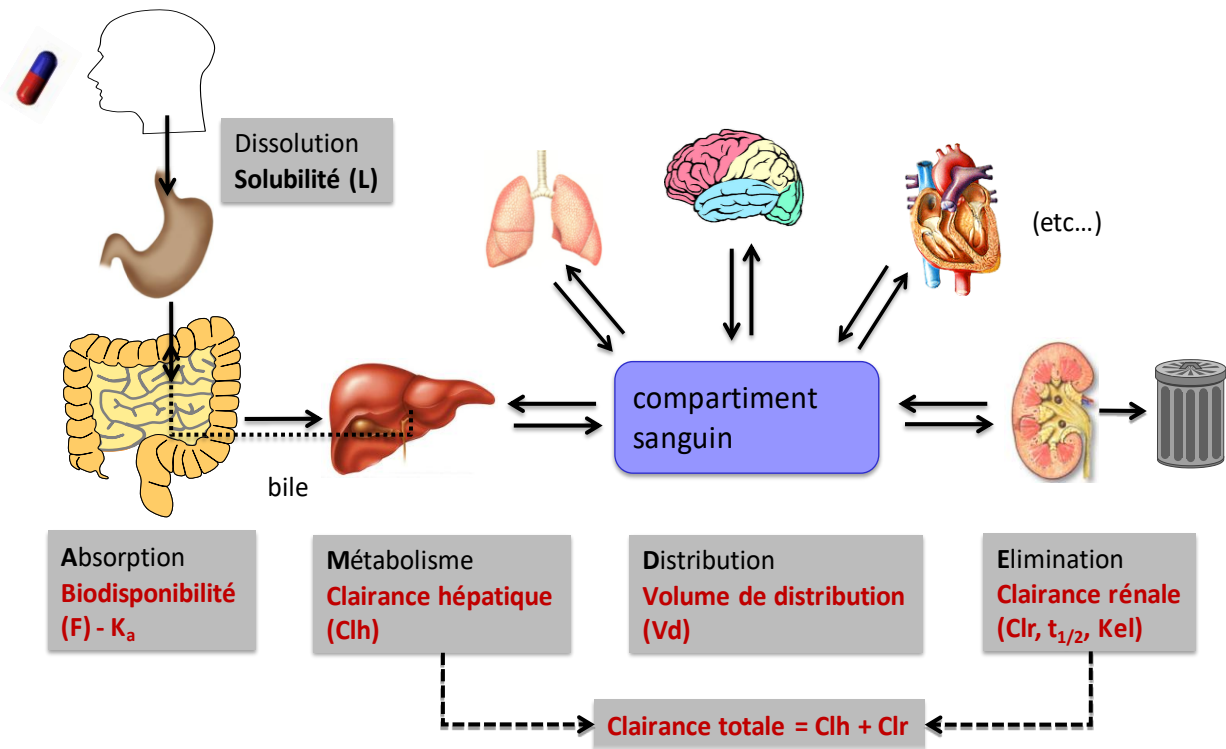


Figure 9 : Les différentes étapes de la pharmacocinétique (système A-D-M-E)

L'étude de ces paramètres pharmacocinétiques permet l'observation mais surtout la compréhension des concentrations circulantes de principe actif chez un patient donné. Après mesure des concentrations plasmatiques en principe actif, on peut évaluer le niveau d'exposition du patient au traitement, c'est le suivi thérapeutique pharmacologique « **Therapeutic Drug Monitoring** ».

Par ailleurs, l'étude de la relation entre concentrations circulantes et l'effet thérapeutique (efficacité + toxicité) constitue la pharmacodynamie. Associé à la pharmacocinétique, celles-ci ont pour objectif d'établir des zones thérapeutiques et de déterminer des posologies optimales²⁹.

1. Absorption

L'absorption, aussi appelée résorption est la première étape du processus ADME. Elle consiste au passage du médicament de son lieu d'application dans la circulation sanguine.

Deux phénomènes rentrent en jeu :

- ⇒ La résorption : **passage de la membrane**
- ⇒ **L'effet de premier passage**

La résorption est essentiellement réalisée par diffusion passive qui est modélisé par la loi de Fick :

$$V = \frac{D \times K_s \times S \times (C_e - C_i)}{a}$$

V = vitesse pour atteindre l'équilibre

D = coefficient de diffusion

K_s = coefficient de partage

S = surface de membrane

(C_e-C_i) = différence de concentration de part et
autre de la membrane

a = épaisseur de la membrane

Elle est conditionnée par : le pH du milieu, le pKa (constante d'acidité), la liposolubilité et la forme galénique du médicament. Ce qui signifie que la qualité de la résorption sera différente en fonction de la voie d'application du médicament et des propriétés physico-chimiques de ce dernier³⁰.

Par exemple lors d'une administration par voie gastro-intestinale, la qualité de l'absorption ne sera pas la même selon l'organe du tube digestif concerné. L'estomac d'une superficie de 1m² et de pH très acide (<2), ne peut avoir une absorption similaire à l'intestin dont la superficie est d'environ 200m² et où le pH plus proche de la neutralité.

De plus la qualité et la quantité des transporteurs membranaires propres à chaque organe du tube digestif vont tout autant influencer le passage des membranes des différents principes actifs. D'autres critères propres à l'individu, comme l'alimentation, la vitesse de vidange gastrique impactent sur le temps de latence du médicament sur son lieu d'absorption et donc sur sa résorption³¹.

Tandis que pour une application cutanée, d'autres critères vont être pris en considération pour évaluer la qualité de la résorption. L'état de la peau, la surface et la localisation, la température, l'âge du patient vont influencer cette absorption mais également la taille moléculaire ou la lipophilie du principe actif seront des paramètres décisifs pour une résorption optimale.

Chaque voie d'administration aura des caractéristiques propres qui influenceront l'absorption du médicament et ainsi la quantité réelle de principe actif atteignant la circulation systémique. Il est donc indispensable d'adapter les paramètres physico-chimiques du médicament afin d'optimiser la résorption et d'atteindre la concentration plasmatique souhaité.

L'effet de premier passage est la transformation du médicament par métabolisme avant son arrivée dans la circulation générale. Cela se produit dès son premier contact avec l'organe responsable de la biotransformation. Cette transformation peut aboutir à une perte de substance active. Ainsi on appelle premier passage tout ce qui relève d'un métabolisme qui va toucher la molécule entre le moment où il va être administré et le moment où il va atteindre la circulation systémique³⁰.

Les organes concernés sont le foie essentiellement, le tube digestif et les poumons en moindre importance.

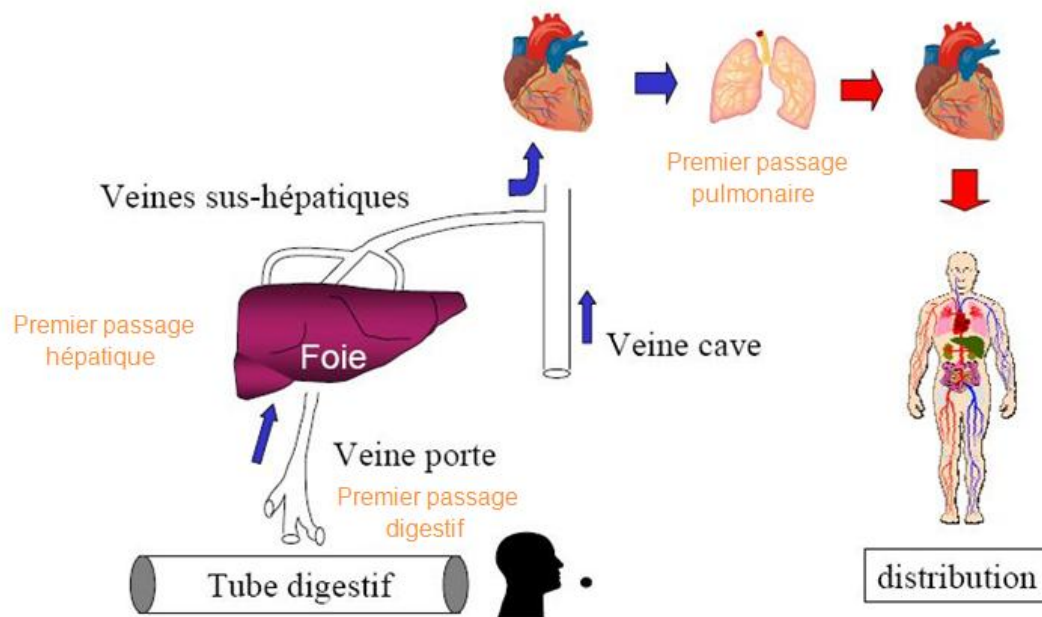


Figure 10 : L'effet de premier passage⁶

Les voies veineuses et artérielles permettent de s'affranchir de la notion de résorption et de premier passage digestif. La voie artérielle échappe aussi à l'effet de premier passage hépatique, ce qui n'est pas forcément le cas de la voie veineuse.

La plupart des systèmes de biotransformation servent à transformer des composés peu polaires en composés plus polaires, car à partir d'un certain degré de polarité, la molécule est plus facilement éliminable par l'organisme. Ainsi ces phénomènes de premier passage servent à aider l'organisme à se débarrasser d'éventuelles molécules toxiques, qui pourraient rester stockées dans les tissus profonds si elles étaient trop lipophiles.

La résorption et l'effet de premier passage déterminent la **biodisponibilité** du médicament. La biodisponibilité est la fraction ou pourcentage de médicament atteignant la circulation générale après administration orale et vitesse à laquelle se produit ce phénomène. Elle est relative lors d'une administration par voie orale, c'est pourquoi on l'estime en fonction de la voie parentérale où la biodisponibilité est absolue. Par ailleurs elle est conditionnée par la quantité résorbée et la quantité éliminée par effet de 1^{er} passage²⁹.

$$F = f \times f'$$

f = fraction résorbée
f' = fraction qui échappe au métabolisme

L'absorption est une étape de pharmacocinétique influencée par de très nombreux facteurs chimiques et moléculaires du médicament mais également des facteurs propres aux patients qui sont source de variabilité inter et intra-individuelles.

2. Distribution

La distribution est le passage du médicament du compartiment sanguin vers les tissus (site d'action). Deux grands processus définissent cette distribution :

- ⇒ La possibilité d'interaction avec les constituants du sang
- ⇒ La vitesse de diffusion vers les tissus et organes cibles

Interaction avec les constituants du sang

A chaque instant un médicament dans le compartiment sanguin va se répartir en deux formes, la forme libre et la forme liée aux protéines plasmatiques. Or seule la forme libre du médicament est active, diffuse, est biotransformable et éliminable. C'est donc uniquement la fraction libre du médicament qui est capable d'exercer un effet pharmacologique. La forme liée est une forme de stockage ou de transport. La fixation étant réversible, le complexe formé se dissocie au fur et à mesure que la forme libre diffuse et quitte le lit vasculaire³⁰.

Les principales protéines plasmatiques concernées par la liaison aux médicaments sont l'Albumine en majorité (difficilement saturable), α_1 glycoprotéine acide et les lipoprotéines.

Le nombre de site de fixation impacte directement sur la fraction libre de médicament. Il dépend de la concentration en protéines et permet de calculer la fraction libre.

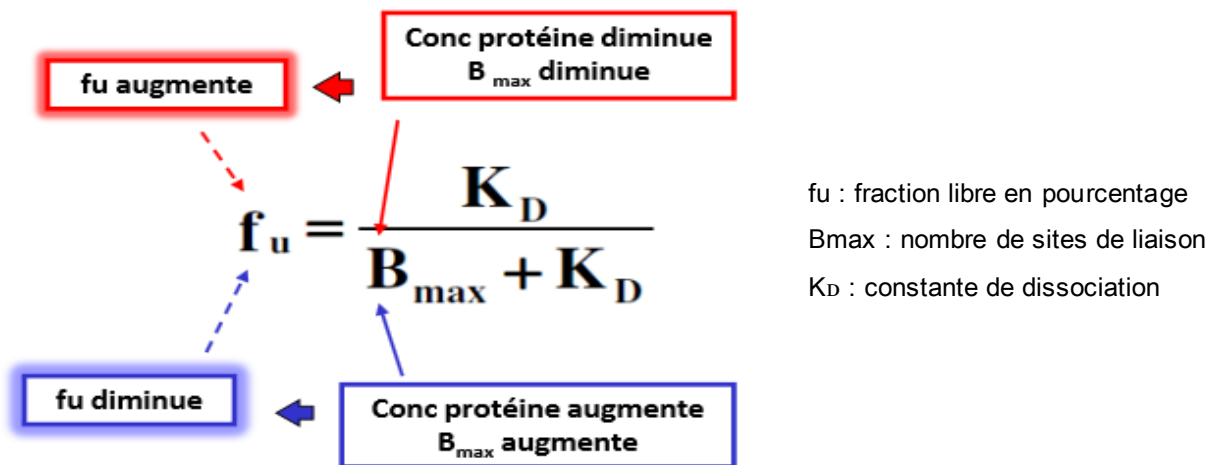


Figure 11 : Relation entre la fraction libre du médicament et le nombre de site de fixation libre

Tout ce qui influence la protéinémie influence la fixation protéique du médicament et par conséquent sa diffusion. Les facteurs tels que la présence de pathologie inflammatoire, la modification de la conformation de l'albumine, l'âge du patient, la dénutrition, ou encore la compétition/interaction sur un même site de fixation peuvent être source de fluctuation entre la fraction libre et liée du médicament. Influençant ainsi la diffusion vers la cible et l'effet pharmacologique du traitement³¹.

Diffusion tissulaire

La diffusion tissulaire est la sortie du lit vasculaire du principe actif par endocytose, pinocytose. Cette diffusion tissulaire impacte sur l'activité thérapeutique si le médicament diffuse dans le tissu cible mais également sur la toxicité si ce dernier diffuse dans un tissu sain. La diffusion est aspécifique.

De nombreux facteurs ici encore vont influencer cette diffusion tissulaire, l'âge avec toutes les modifications tissulaires qui en émanent, le sexe et les co-morbidités.

Un médicament lipophile aura plus tendance à diffuser dans le tissu adipeux et y rester stocké responsable de possible toxicité. De plus l'atteinte de l'organe cible est dépendante du niveau de vascularisation. Toute altération du débit cardiaque va se traduire par une baisse de perfusion des organes avec possible impact sur la phase de distribution.

Le volume de distribution représente le volume dans lequel va se diffuser, se distribuer le médicament, il permet de quantifier la répartition de celui-ci dans l'organisme.

Le volume de distribution initial est le rapport entre la dose administrée par voie parentérale et la concentration plasmatique ou sanguine du médicament extrapolée au temps 0.

$$V = \frac{Dose}{C_0} \quad \text{exprimé en litre ou en L/kg}$$

Le volume apparent de distribution, à l'état d'équilibre, se définit comme une constante de proportionnalité entre la quantité de médicament dans l'organisme et la concentration mesurée dans le milieu de référence choisi.

$$V = \frac{\text{Qte de M dans l'organisme}}{\text{Concentration du M dans le plasma}}$$

Le volume de distribution est influencé par des facteurs physiologiques tels que l'âge, la grossesse, l'IMC (indice de masse corporel) mais aussi des facteurs pathologiques comme l'insuffisance hépatique ou rénale³¹.

3. Métabolisation

La métabolisation des médicaments est la **biotransformation** de ces derniers notamment pour faciliter leur élimination.

Ces biotransformations peuvent avoir lieu dans de nombreux organes, membranes intestinales, poumons, reins, kératinocytes, mais l'organe qui joue un rôle essentiel dans cette étape de métabolisation est de loin le foie (au niveau des hépatocytes). Elles consistent à rendre les molécules plus hydrophiles afin de favoriser leur élimination par voie urinaire, diminuant ainsi la demi-vie des médicaments et leurs métabolites²⁹.

La biotransformation du principe actif peut aussi conduire à des métabolites actifs, porteurs d'une activité thérapeutique similaire ou différente de celle de produit parent. Si cet effet est recherché on parle alors de « prodrug ». Toutefois des métabolites toxiques peuvent également émaner de ces transformations.

Les protéines qui jouent un rôle majeur des ces biotransformations sont des enzymes de type cytochrome, notamment les cytochromes P450. Ces cytochromes ne métabolisent pas uniquement les médicaments, ils ont de nombreuses fonctionnalités physiologiques afin de préserver l'homéostasie et dans la synthèse de produits endogènes ; vitamines, cholestérol, hormones...

La qualité de cette métabolisation par le foie peut être estimée grâce à deux grands paramètres, la **clairance hépatique** et **l'élimination biliaire**.

La clairance est un paramètre qui permet de quantifier la capacité de l'organisme à éliminer un xénobiotique. Il en découle la définition de la clairance hépatique qui est le volume de sang hépatique totalement débarrassé d'un médicament par unité de temps.

$$\textit{Clairance hépatique} = Q \times E = Q \frac{(C_a - C_v)}{C_a}$$

Q : débit sanguin du foie en L/min

E : coefficient d'extraction

C_a : concentration entrante

C_v : concentration sortante

Lors de la métabolisation, la molécule peut ne pas se retrouver à la sortie de l'organe car elle a été éliminée au cours de ce processus, ou peut parfois être excrétée par voie biliaire. C'est pourquoi la clairance hépatique est la somme de la clairance hépatique métabolique et de la clairance biliaire.

Tous les médicaments ne sont pas concernés par cette élimination biliaire, cela touche essentiellement les molécules à haut poids moléculaire. L'excrétion biliaire repose sur un transport actif avec des pompes à efflux, il s'agit donc d'un phénomène saturable avec possibilité d'interaction, d'inhibition, d'induction ou de compétition. Par ailleurs une fois que le médicament se retrouve dans la voie biliaire puis dans le tube digestif, il peut arriver que ce dernier soit de nouveau absorbé ; c'est le cycle entéro-hépatique, avec un **effet rebond** sur les concentrations observées.

La métabolisation est affectée par de nombreux facteurs, tout d'abord les facteurs dit physiologiques tels que l'âge ou la grossesse mais aussi pathologique impactant sur la fonction hépato-biliaire.

Par exemple les agents immunosuppresseurs et immunomodulateurs sont bien connus pour leur hépatotoxicité.

Un risque d'interaction est également possible lors de la prise concomitante d'autres substances ou médicaments dits inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques. La métabolisation en sera influencée, notamment lors de la consommation de tabac et d'alcool qui sont tous d'eux inducteurs des cytochromes.

Par ailleurs d'autres facteurs de variabilité peuvent influencer cette étape comme les variations environnementales notamment. Là encore il s'agit d'une étape du processus ADME qui est source de **variabilité inter et intra-individuelle**.

4. Elimination

L'étape de l'élimination regroupe une élimination directe qui est l'élimination rénale et/ou biliaire, et une élimination indirecte issue des biotransformations.

L'organe phare de cette élimination est le rein. C'est pourquoi la **clairance rénale** va avoir toute son importance pour évaluer la qualité de l'élimination du médicament.

Au cours de l'élimination rénale trois phénomènes rentrent en jeu : la filtration glomérulaire et tubulaire - la sécrétion – la réabsorption. Il en ressort cette relation :

$$\text{Clairance rénale} = (\text{CI Filtration} + \text{CI Sécrétion}) - \text{Réabsorption}$$

- La filtration glomérulaire est le principal mécanisme d'élimination urinaire des médicaments et permet de former l'urine primitive.

C'est un phénomène passif d'ultrafiltration qui va reposer sur le différentiel de pression entre le plasma et le compartiment urinaire d'une part, ainsi que sur la perméabilité glomérulaire d'autre part. Elle ne concerne que la fraction libre des médicaments de taille assez petite.

$$\text{CI filtration} = f_u \times \text{DFG}$$

avec f_u : fraction libre

DFG : débit de filtration glomérulaire

Le débit de filtration glomérulaire est propre à chaque patient et non pas à chaque médicament.

- La sécrétion n'est pas un mécanisme systématique, cela concerne essentiellement la forme hydrosoluble de la fraction libre de la molécule et parfois la fraction liée. Elle est réalisable grâce à la présence de transporteurs actifs. Ces transporteurs sont impliqués dans les interactions médicamenteuses et peuvent être impactés par des polymorphismes génétiques.

- La réabsorption, là aussi, il ne s'agit pas d'un mécanisme systématique. Cela concerne principalement la forme non ionisée et plutôt liposoluble du médicament qui est déjà excrété au niveau urinaire. La réabsorption peut se réaliser soit par transport passif selon le gradient de concentration ou électrique, soit par transport actif pour les molécules ionisées. Il faut savoir que le pH urinaire est physiologiquement variable entre 4 et 7.5, tandis que le pKa de la molécule est fixé. C'est pourquoi le pourcentage de molécule sous forme ionisée dans le compartiment urinaire, qui est susceptible d'être réabsorbé, dépend du pH urinaire. Ainsi toute modification de la réabsorption rénale modifie la clairance rénale, soit l'exposition à la molécule active.

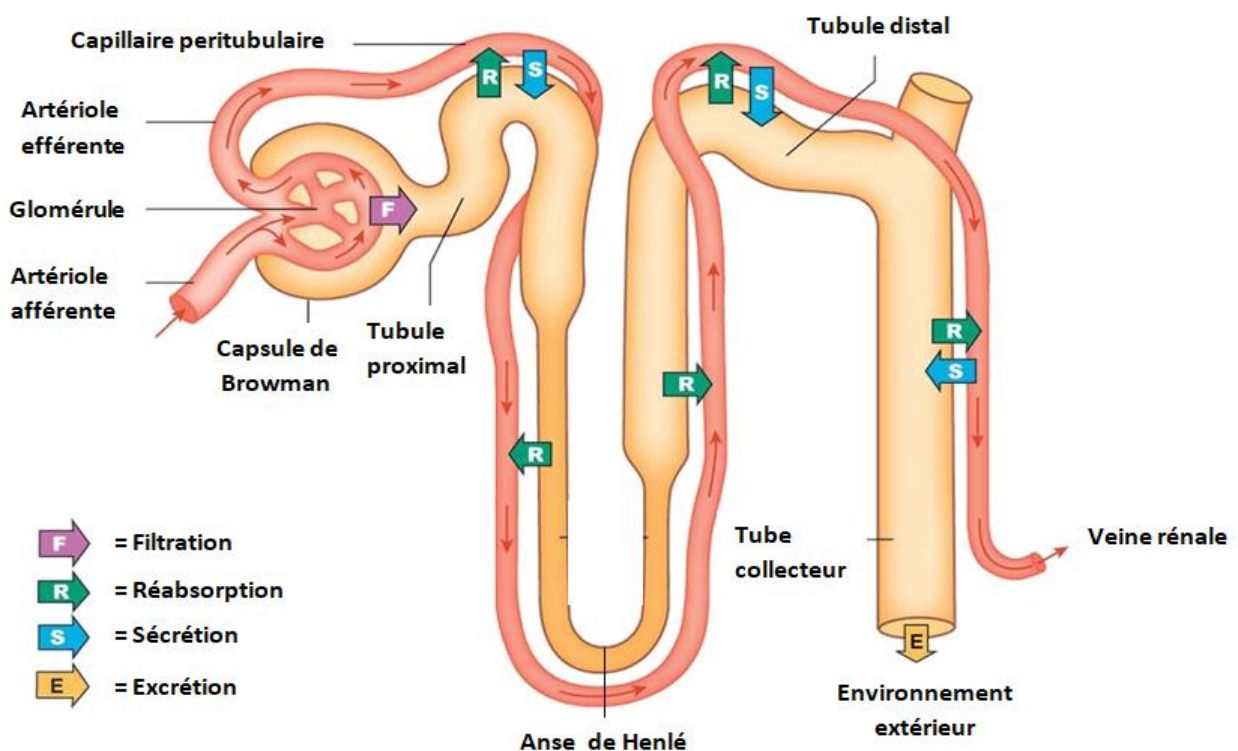


Figure 12 : Processus d'élimination rénale

L'élimination rénale peut être impactée par les médicaments responsables d'insuffisance rénale fonctionnelle tels que les diurétiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou encore les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les sartans.

D'autres médicaments néphrotoxiques tels que les anticancéreux, immunosuppresseurs, et les produits de contraste iodés qui peuvent quant à eux, provoquer des insuffisances rénales chroniques, vont influencer les différents processus mis en jeu au cours de l'élimination rénale. De ce fait la co-médication notamment avec des traitements affectant le pH urinaire ou la fonction rénale n'est pas une variable négligeable.

Ainsi l'étude de la pharmacocinétique est indispensable pour tenter de prédire mais surtout comprendre la réponse thérapeutique d'un patient à son traitement mais également pour prévenir les effets indésirables et les toxicités susceptibles d'être déclenchés par une surexposition à la molécule active. Il s'agit d'une étude complexe principalement due à l'immense variabilité inter et intra individuelle présente à chaque étape du système ADME. Cela est d'autant plus vrai dans les cas particuliers où l'on utilise des molécules difficilement maniables notamment dans le domaine de la cancérologie.

b. Pharmacocinétique des biothérapies

La pharmacocinétique est importante pour déterminer le devenir du médicament au sein de l'organisme et afin d'optimiser l'atteinte de la cible pharmacologique pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité.

En revanche le schéma ainsi que les mécanismes qui régissent les différentes étapes de la pharmacocinétique précédemment cités ne sont pas applicables aux biothérapies.

Les principes de la pharmacocinétique sont très bien connus pour les « petites molécules ». Cependant les biothérapies ne rentrent pas dans cette catégorie de molécule. De par leur nature d'immunoglobuline, se sont de grosses molécules. Par conséquent elles ne pourront pas suivre de la même façon le système A-D-M-E tel que nous l'avons vu³².

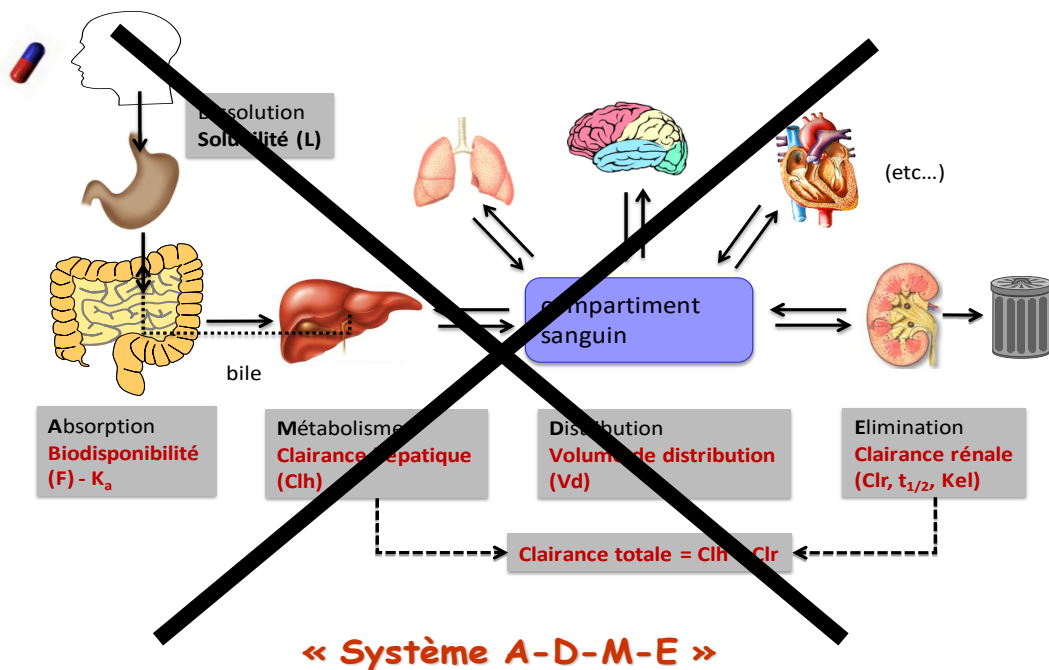


Figure 13 : Inconciliabilité des biothérapies avec le système A - D - M - E

Toutefois, l'optimisation d'une molécule à but thérapeutique est indispensable pour envisager de nouvelles opportunités de découverte d'un traitement notamment dans les pathologies jusqu'à présent incurables. Il s'agit d'un cas de figure régulièrement retrouvé dans le domaine de la cancérologie. C'est pourquoi, malgré le fait que les biothérapies ne suivent pas le schéma pharmacocinétique standard, l'étude de leur propriété physico-chimique et leur devenir au sein de l'organisme reste indispensable afin d'optimiser leur chance d'atteindre la cible et par conséquent d'exercer un effet ciblé sur la maladie.

1. Principales différences pharmacocinétique des biothérapies

- L'absorption : les anticorps monoclonaux sont exclusivement administrés par **voie injectable**, la voie orale n'est pas envisageable de par leur dégradation dans le tractus digestif. L'administration en sous-cutané ou en intramusculaire réduit de plus de moitié la biodisponibilité des molécules dû à une dégradation protéolytique, nécessitant une augmentation considérable des doses afin d'obtenir une concentration plasmatique thérapeutique³².
- Distribution : les anticorps monoclonaux sont de grosses molécules, réduisant leur diffusion tissulaire. L'atteinte des tumeurs solides est par conséquent difficile. Le volume de distribution est à défaut centré sur le volume plasmatique de par cette diffusion extravasculaire très faible qui est un obstacle à l'efficacité de la thérapie. Cette notion de faible diffusion ne permet à la biothérapie que de rester à la surface de la tumeur, au niveau d'éventuel récepteur extracellulaire. Une fois les sites de fixation saturés par les anticorps correspondant à la concentration minimale efficace, il est alors inutile d'augmenter davantage les doses du traitement au risque de provoquer des toxicités^{32 33}.
- La clairance : composante essentielle du métabolisme et élimination. Celle-ci se voit modifiée dans différents cas de figure, propres aux anticorps monoclonaux.

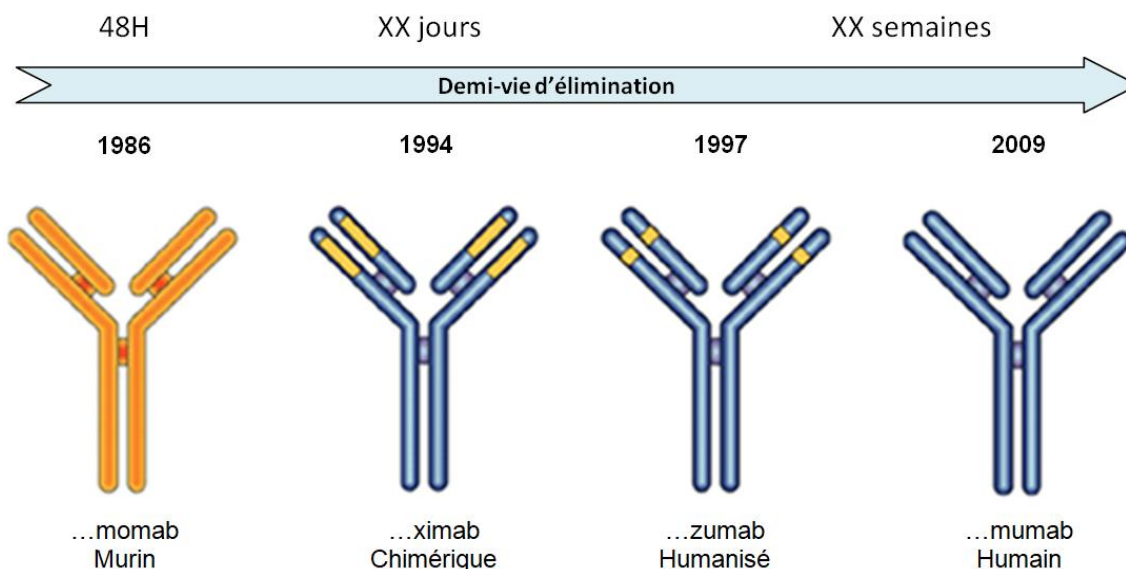


Figure 14 : Evolution de la demi-vie des anticorps monoclonaux au cours du temps

La clairance, l'élimination des biothérapies a été modifiée grâce aux nouveaux processus de fabrication. Les premiers anticorps fabriqués, les anticorps monoclonaux murins de par leurs natures étrangères sont éliminés de façon beaucoup plus soudaine que les nouveaux anticorps mis au point, les anticorps monoclonaux humains.

L'élimination est réalisée au sien de l'organisme d'une part par **dégradation protéolytique**, processus difficilement saturable.

Le polymorphisme génétique au niveau de la partie constante des anticorps est source de variation des paramètres pharmacocinétiques, car un organisme ne reconnaissant pas cette partie de la biothérapie administrée aura tendance à activer de façon plus précoce la dégradation protéolytique, réduisant ainsi sa demi-vie.

D'autre part l'élimination des biothérapies est également possible par la synthèse de l'organisme d'anticorps dirigés contre les anticorps administrés (**Anticorps Anti-MoABs**), ce qui risque là encore d'augmenter la clairance d'élimination.

Le phénomène d'endocytose réalisé par les cellules afin de faire quitter le lit vasculaire est non spécifique dans le cas des anticorps monoclonaux. De plus dans certains cas cela peut se traduire par une simple protection intracellulaire (concerne les cellules endothéliales et rénales) de l'anticorps, qui sera par la suite remis dans la circulation sanguine.

Le Target-Mediated Drug Disposition (TMDD- élimination du médicament par la cible) est le dernier mécanisme de clairance qui est propre aux biothérapies.

Cela repose sur la disparition des anticorps du plasma et des fluides extracellulaires de par leur consommation par la cible. Il s'agit d'une voie saturable. Ainsi la clairance de la biothérapie va croître avec le nombre de cible c'est-à-dire en fonction du volume tumoral.

À l'inverse, les très petites molécules, voient leurs concentrations circulantes influencées essentiellement par la biotransformation hépatique et l'excrétion rénale. La part d'anticancéreux consommé par la cible est minime. Le TMDD est ainsi très spécifique des biothérapies³⁴.

Si on administre une quantité fixe de médicament par rapport au récepteur à chaque nouvelle cure, et que la quantité de récepteur varie, on aura des taux circulants de biothérapie différents à chaque cure. Donc à dose fixe on observe une modification des paramètres pharmacocinétiques et par conséquent une modification de la clairance, c'est le phénomène de non stationnarité pharmacocinétique.

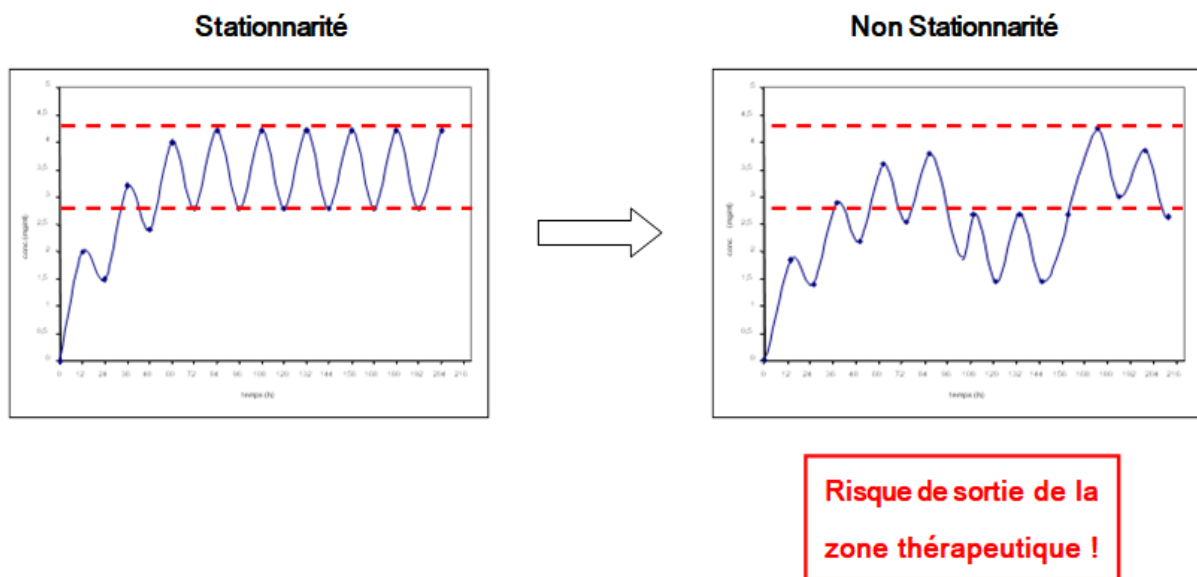


Figure 15 : Stationnarité pharmacocinétique vs non stationnarité pharmacocinétique⁷

La conservation de la stationnarité est importante afin de maintenir le patient dans la zone thérapeutique efficace.

La pharmacocinétique des biothérapies est fondamentalement différente de celle des petites molécules habituellement retrouvées dans les autres classes d'anticancéreux.

Petites molécules	Biothérapies
➤ Absorption orale	➤ Faible passage membranaire
➤ Passage membranaire	➤ Pas d'extraction hépatique
➤ Extraction hépatique	➤ Dégradation protéolytique
➤ Filtration glomérulaire	➤ TMDD
➤ Demi-vie variable	➤ Demi-vie longue
	➤ Pas d'élimination rénale directe

Tableau 2: Différence pharmacocinétique entre les petites molécules et les biothérapies

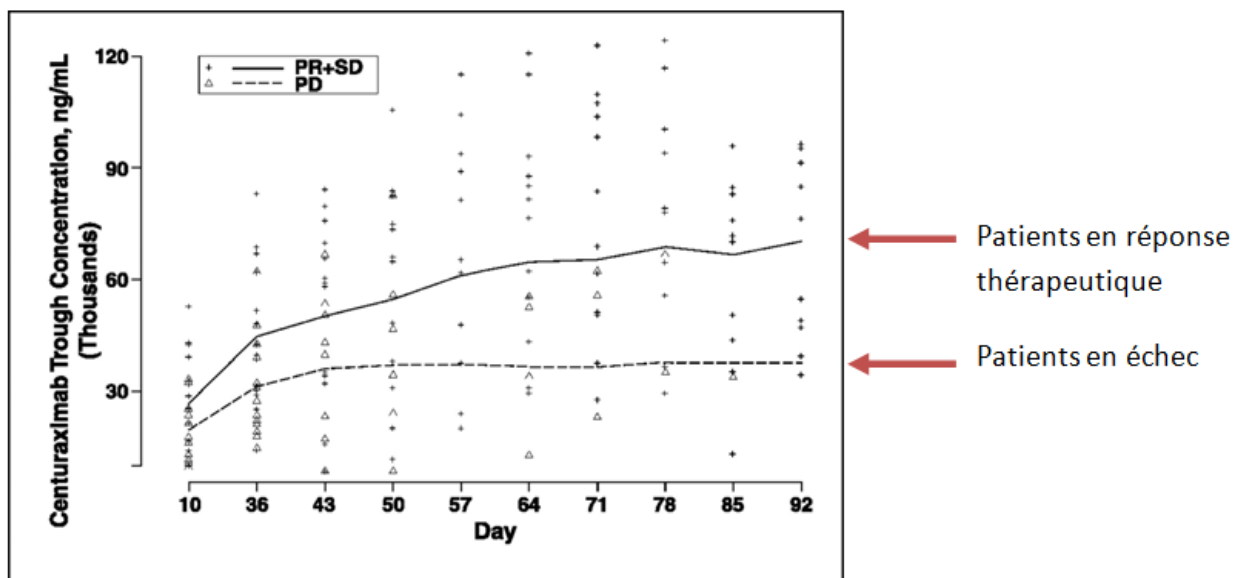
À l'inverse des petites molécules, nous ne disposons pas encore assez d'études sur les biothérapies permettant d'en anticiper la pharmacocinétique et la variabilité inter et intra-individuelle (insuffisance rénale – hépatique – obésité – co-médication)³⁵.

2. Comment anticiper la pharmacocinétique des biothérapies malgré ces différences ?

Comme pour la plupart des médicaments, il existe une relation entre dose administrée, l'exposition plasmatique et la pharmacodynamie (toxicité + efficacité).

Grâce à ces relations nous pouvons tenter de comprendre, d'anticiper et prédire l'efficacité et/ou la toxicité du traitement. Il est donc primordial de comprendre la pharmacocinétique des biothérapies.

Dans le cas du cétuximab, afin d'anticiper la réponse pharmacodynamique, des études cliniques ont été réalisées sur des patients atteints de tumeurs solides et traités par cétuximab³⁶. L'objectif de l'une d'entre elle étant de déterminer une dose thérapeutique offrant un bon rapport bénéfice/risque. Au cours de cette étude il a été observé la présence d'un différentiel de concentration minimale circulant en anticorps monoclonal dans le sang entre les patients en réponse thérapeutique et ceux en échec. Les patients en réponse thérapeutique avaient une concentration minimale circulante en anticorps monoclonal supérieur aux patients en échec.



Paula M. Fracasso et al. Clin Cancer Res 2007;13:986-993

Figure 16 : Variations des concentrations sériques chez les patients traités par cétuximab

Cette étude nous amène à la conclusion que les **concentrations sériques en biothérapie impactent sur l'efficacité du traitement.**

De plus une autre étude portant sur l'impact de la pharmacocinétique du cétuximab sur la survie sans progression des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique a permis de mettre en évidence l'influence de la clairance globale du cétuximab sur la survie sans progression. La clairance globale étant elle-même estimée à partir de la concentration résiduelle en cétuximab. Ainsi la pharmacocinétique peut également être utilisée comme biomarqueur prédictif de survie dans les traitements par biothérapies³⁶.

La relation entre les concentrations sériques et l'efficacité est donc bien réelle, cependant la variabilité importante de la pharmacocinétique est un problème de taille. On sait que la pharmacocinétique impacte sur la pharmacodynamie des biothérapies toutefois les doses standards ne sont pas des doses optimales pour tous les patients. Au cours des essais cliniques les patients sont sélectionnés selon des critères bien définis, ainsi on obtient un nombre limité de patients aux grandes similitudes (patients standardisés). Or les patients qui recevront le traitement une fois mis sur le marché seront indéniablement différents des patients sélectionnés lors des essais cliniques. C'est la variabilité interindividuelle. C'est pourquoi les doses étudiées au cours des essais ne seront pas adaptées à la majorité des patients.

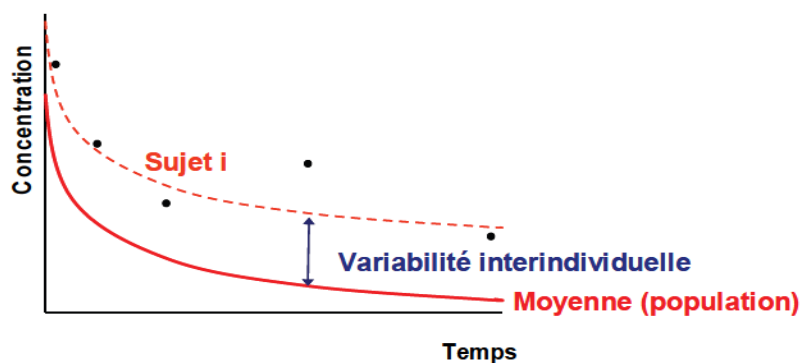


Figure 17 : Représentation de la variabilité interindividuelle face à une population type

Malgré cette variabilité pharmacocinétique importante la concentration minimale circulante doit être respectée. Le dosage régulier des biothérapies est donc primordial. Cela peut néanmoins être plus difficile qu'il n'y paraît au premier abord, car nous manquons de méthodes de dosage adaptées aux biothérapies.

L'objectif premier en oncologie chez les patients atypiques sur le plan pharmacocinétique, est d'associer les stratégies de **suivi thérapeutique pharmacologique** à **l'individualisation de posologie** afin de leur assurer une prise en charge thérapeutique personnalisée.

V. CETUXIMAB

a. La voie EGF

Les récepteurs au facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR également connu sous le nom de HER1) sont des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Les récepteurs EGF sont des récepteurs transmembranaires présentant un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte elle l'activité tyrosine kinase.

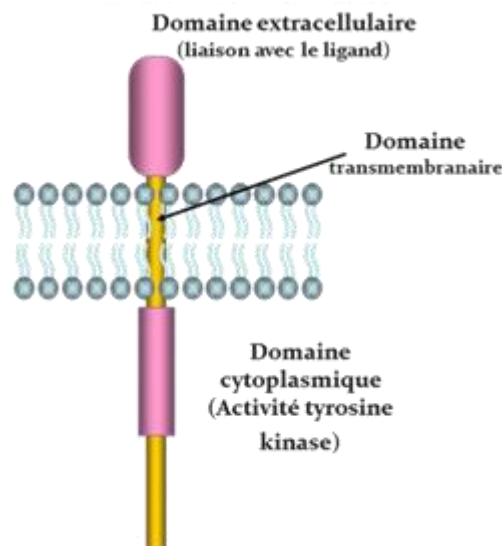


Figure 18 : Récepteur à activité tyrosine kinase transmembranaire⁸

A l'état physiologique on retrouve ces récepteurs dans de nombreux tissus, tels que les tissus épithéliaux ou mésenchymateux. Dans ces tissus ces récepteurs vont jouer un rôle important dans le développement, la prolifération, la différenciation mais aussi dans les processus d'angiogenèse et d'apoptose.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de ces récepteurs se produit suite à la fixation d'un ligand, un facteur de croissance sur ces derniers entraînant une dimérisation puis une autophosphorylation ce qui induit un changement de conformation de la partie intracellulaire. La conséquence principale est l'induction de signaux de prolifération pouvant suivre plusieurs voies de transduction, parmi lesquelles la voie MAP kinase et la voie PI3 kinase sont les plus connues³⁶.

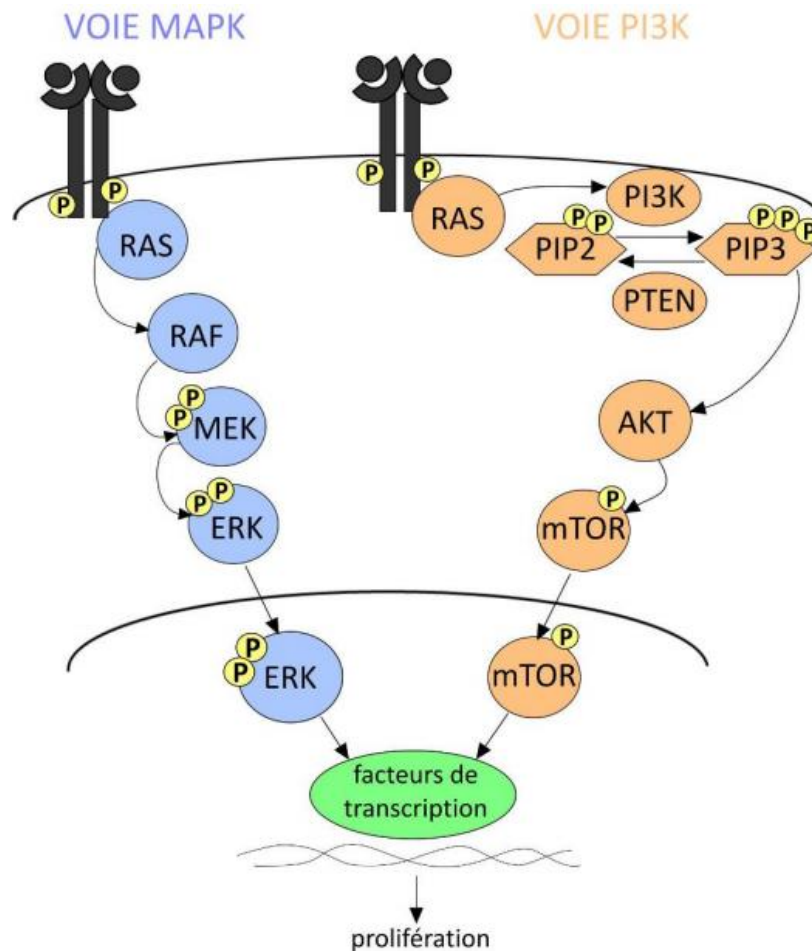


Figure 19 : Voie MAP kinase et PI3 kinase⁹

La voie RAS/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est une voie de signalisation intracellulaire essentielle dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie mais également dans la migration cellulaire notamment au cours du processus d'angiogenèse. Cette voie est majoritairement activée par les récepteurs membranaires EGF eux même activés par des facteurs de croissance.

Le récepteur EGF actif suite à la fixation d'un ligand enclenche une cascade de phosphorylation successive. Après la dimérisation, l'autophosphorylation du récepteur dans sa partie intracellulaire génère la phosphorylation de son résidu tyrosine. Ce résidu phosphorylé peut à présent servir de site d'amarrage pour un certain nombre de protéines intracellulaires contenant un domaine Src homology-2 (SH2) capable de reconnaître ces tyrosines phosphorylées. Les protéines RAS sont des protéines possédant un domaine SH2.

Lorsque la protéine RAS se retrouve fixée au résidu tyrosine phosphorylé du récepteur, celle-ci s'active permettant ainsi l'activation de la voie RAS/MAPK mais également la protéine PI3K qui elle une fois active phosphoryle certains lipides membranaires aboutissant au recrutement de la kinase AKT dans la voie PI3K/AKT. Ainsi l'activation de l'EGFR aboutit à l'activation de ces deux voies de signalisations impliquées dans la migration, la prolifération mais aussi dans les processus de résistance à l'apoptose et d'angiogenèse¹⁰.

Néanmoins, il a été démontré que le récepteur EGF avait un rôle prédominant dans la genèse de nombreux cancers épithéliaux notamment les cancers colorectaux où ce récepteur est surexprimé dans 30 à 85% des cas³⁷. Par ailleurs, les récepteurs appartenant à la famille EGF ainsi que leurs facteurs de croissance font parti des premiers oncogènes identifiés soit les plus étudiés et les mieux compris³⁸.

La plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase sont codés par des proto-oncogènes. Ainsi lors d'une modification qualitative ou quantitative du gène codant, le récepteur se retrouve suractivé déclenchant la cascade de phosphorylation et d'activation des protéines de la cellule.

Par cette **constante activation** du récepteur et de ces protéines, la cellule devient **cancéreuse**. Ce phénomène fait de ces récepteurs des **cibles** potentielles pour des thérapies anticancéreuses.

Divers mécanismes peuvent rentrer en jeu dans cette activation oncogénique :

- Une **augmentation de l'expression** du récepteur à la surface de la cellule; suite à une augmentation de sa transcription, une stabilisation accrue de la protéine dû à une **inhibition de son internalisation** ou de sa **dégradation**, ou une amplification du gène.
- Une activation permanente du récepteur engendré par une **mutation du gène** de l'EGFR.
- Activation continue du récepteur EGFR de façon **autocrine** par augmentation de l'expression des ligands (TGF α)¹⁰.

La suractivation de l'EGFR engendre une activation continue des voies de signalisation situées en aval, responsable d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de la motilité cellulaire ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'apoptose. Cette activation permanente peut aussi être responsable des phénomènes d'angiogenèse tumoraux.

De plus en clinique, la surexpression d'EGFR est reconnue comme marqueur pronostique de stade tumoral avancé, de la résistance aux approches thérapeutiques standard et de la survie réduite du patient. Cela fait du récepteur EGF une cible thérapeutique centrale dans le développement de nouvelle alternative thérapeutique notamment dans les cancers colorectaux et les cancers des voies aérodigestives supérieures³⁹.

b. Statut KRAS

Les protéines RAS appartiennent à la famille des GTPases, c'est-à-dire que leur activation dépend de l'état de phosphorylation du groupement GTP auquel elles sont liées. Ce dernier étant lui-même régulé par des protéines GAP (GTPase-Activating Protein). Les protéines RAS ont un rôle prédominant dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs EGF membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la survie ainsi que dans l'angiogenèse. La protéine RAS joue ainsi un rôle « **d'interrupteur** » des voies de signalisations RAS/MAPK et PI3K/AKT. L'activation de ces voies est dépendante de l'état actif de la protéine RAS. Celle-ci oscille entre l'état actif lorsqu'elle est liée au GTP et l'état inactif lorsqu'elle est liée au GDP¹⁰.

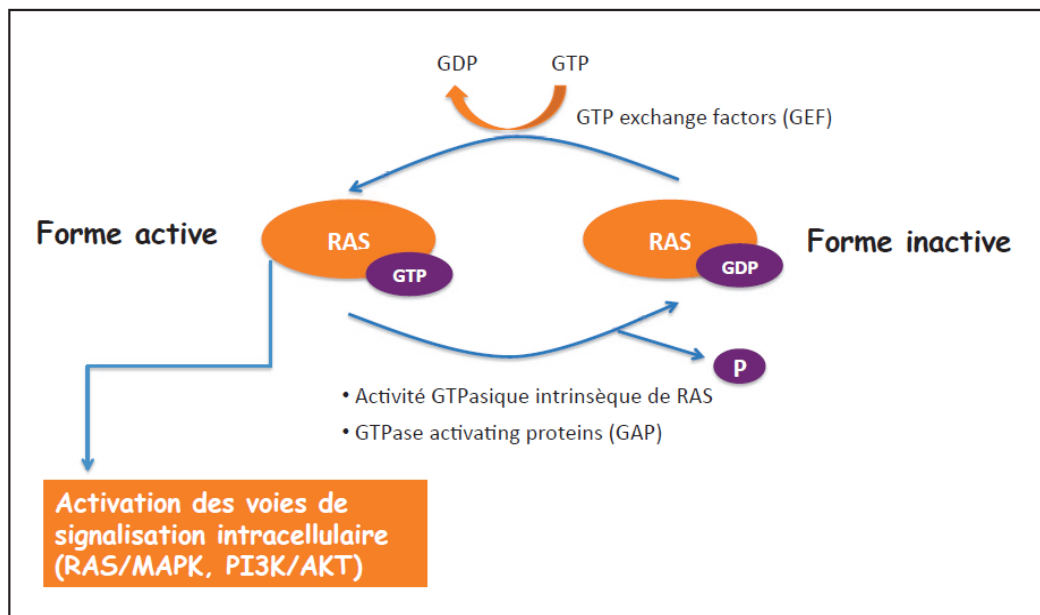


Figure 20: Forme active et inactif de la protéine RAS¹⁰

Le remplacement du GDP par le GTP active la protéine RAS et inversement. L'inactivation de la protéine RAS a lieu lorsque les protéines GAP hydrolysent le GTP en GDP.

La famille des proto-oncogènes RAS est composée de trois gènes bien caractérisés *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. De plus, 20% des tumeurs humaines ont une mutation activatrice du gène ***KRAS***, il fait parti des oncogènes les plus fréquemment actifs dans les cancers. On va retrouver une mutation du gène *KRAS* dans plus de 60% des cancers du pancréas, 40% des cancers colorectaux, 33% pour ceux des voies biliaires. Parmi les cancers ayant une prévalence moindre, les cancers broncho-pulmonaires, 18% ont une mutation de *KRAS* soit principalement dans les cas d'adénocarcinomes et chez les patients fumeurs. 14% pour les adénocarcinomes de l'endomètre et des ovaires.

Les mutations au niveau des gènes *NRAS* et *HRAS* sont beaucoup moins fréquentes et concernent surtout les cancers de la peau et de la thyroïde¹⁰.

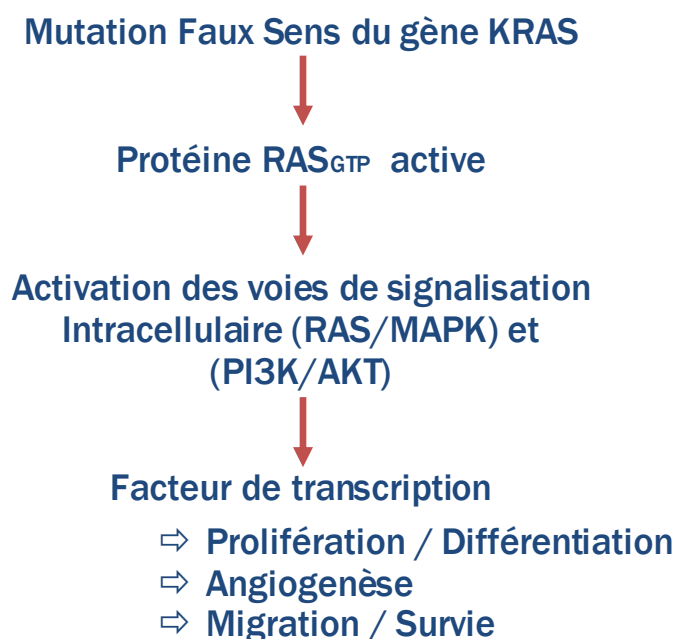


Figure 21 : Cascade suite à la mutation *KRAS*

Une mutation faux sens au niveau des bases du gène *KRAS* active la protéine RAS. L'altération de l'activité intrinsèque GTPase, rend celle-ci inapte à hydrolyser le GTP en GDP, liée à la protéine RAS afin qu'elle retrouve un état inactif. Ainsi l'accumulation de la forme active de la protéine RAS lui confère un pouvoir oncogénique. Suite à la mutation de *KRAS*, la protéine RAS est active, elle-même responsable de l'activation acquise des voies de signalisations RAS/MAPK et PI3K/AKT entièrement indépendante de la fixation du ligand au niveau du récepteur EGF situé en amont. Par conséquent ces cellules tumorales deviennent résistantes aux anticorps anti-EGFR⁴⁰.

c. Cétuximab une molécule bioguidée

La découverte par Köhler et Milstein en 1975 de la technique des hybridomes a permis la sélection et la production d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre une cible unique. Malgré une efficacité décevante au cours des années 80, aujourd'hui plus d'une trentaine d'anticorps monoclonaux ont une autorisation de mise sur le marché dans diverses indications.

Plusieurs nouvelles molécules sont en cours de développement dans le traitement des cancers mais à l'heure actuelle parmi les anticorps monoclonaux déjà sur le marché, quinze soit environ la moitié sont dans le domaine de la cancérologie. Six d'entre eux ciblent directement ou indirectement les récepteurs tyrosine kinases et parmi ces six spécialités deux sont des anticorps anti-EGFR : cétuximab (Erbix®) et panituzumab (Vectibix®) ; deux anticorps anti-HER2 : pertuzumab (Perjeta®) et trastuzumab (Herceptin®) ; ainsi que deux anticorps anti-VEGF : ramucirumab (Cyramza®) et bevacizumab (Avastin®).

Le récepteur EGF est présent de manière constitutive à l'état physiologique dans de nombreux tissus épithéliaux et mésenchymateux, y compris la peau et le follicule pileux. Or la surexpression de l'EGFR a été constatée dans de nombreuses tumeurs épithéliales. Certaines études cliniques ont déterminé que l'expression ou la surexpression de l'EGFR est un marqueur de pronostic de stade tumoral avancé dû à une progression précoce de la maladie, mais aussi à une diminution du taux de survie du patient et à une résistance aux approches thérapeutiques standards. Par conséquent, l'inhibition de la voie de transduction du signal d'EGFR est une cible potentielle pour la thérapie anticancéreuse³⁹.

Le cétuximab (Erbix®) est un anticorps monoclonal chimérique de la classe des IgG1, dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF, c'est à dire qu'il bloque la liaison des ligands (tel que les facteurs de croissance épidermique) au récepteur EGF. Il se lie à l'EGFR avec une affinité qui est approximativement 5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes. Cela induit l'internalisation de l'EGFR, c'est-à-dire une régulation négative de ce dernier.

L'inhibition de la fonction du récepteur permet d'inhiber les voies de signalisation en aval, les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT qui transmettent les messages de transcription au noyau tels que la prolifération, la différenciation ou encore la migration. Par ailleurs le cétuximab a également le pouvoir de recruter les cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps-ADCC). Cependant il ne se lie pas aux autres récepteurs de la famille HER (facteur de croissance épidermique humain) car il est spécifique du récepteur EGF^{36 41}.

Mécanisme moléculaire	Mécanisme d'action
Inhibe la liaison du ligand	Empêche l'activation du domaine de la tyrosine kinase et empêche davantage l'activation en aval des voies de prosurvie.
Inhibe la progression du cycle cellulaire	Le cétuximab provoque un arrêt cellulaire dans la phase d'intervalle G1 du cycle cellulaire via une augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 ainsi qu'une inhibition de PCNA (antigène nucléaire de cellules en prolifération).
ADCC *	Le traitement au cétuximab destiné aux patients atteints d'un cancer du poumon provoque une activité accrue de l'interleukine-2 dans les cellules ADCC par l'activation de cellules tueuses naturelles.
Améliore l'apoptose	Le traitement avec le cétuximab ou d'autres anticorps anti-EGFR similaires modifie l'équilibre des protéines Bcl-2 (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique) pour favoriser davantage l'apoptose.
Améliore les effets anti-tumoraux des radiations	Les tumeurs sont plus radiosensibles avec le traitement au cétuximab en raison de la promotion d'une phase plus vulnérable du cycle cellulaire. Le transport nucléaire du récepteur EGF induit par rayonnement est inhibé par un traitement au cétuximab.
Inhibition du domaine de la tyrosine kinase	Inhibe la transduction du signal de l'EGFR, empêchant la signalisation en aval

*(cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)

Tableau 3 : Mécanisme d'action des inhibiteurs EGFR¹⁴

Il dispose d'une AMM en France depuis juin 2004. Il a eu pour première indication le cancer colorectal métastatique, seul ou en association à une chimiothérapie. Il est actuellement indiqué aussi dans le cancer épidermoïde de la tête et du cou, en association à la radiothérapie en cas de maladie localement avancée ou à une chimiothérapie à base de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique. Mais dans les deux cas l'absence de mutation du gène *KRAS* est de rigueur.

Des études précliniques ont défini la dose biologique optimale de traitement à base de cétuximab comme étant la dose où l'EGFR serait complètement saturé, afin qu'une inhibition maximale de la croissance tumorale soit obtenue. Les premières recherches sur le cétuximab ont suggéré que la saturation complète de la liaison EGFR pourrait être associée à une clairance systémique de l'anticorps. Ceci a été obtenu grâce à une administration de 400 mg / m² de cétuximab pour la première semaine puis à une **périodicité de 250mg/m² hebdomadaire**³⁶.

La perfusion du cétuximab doit être précédée d'une administration d'antihistaminique et de corticoïde au moins une heure avant. Cela permet de prévenir la survenue d'une réaction allergique pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique. Ce type de réaction allergique au cétuximab mène à une contre-indication pour le patient.

Les effets indésirables retrouvés suite à une cure de cétuximab sont nombreux et divers. Beaucoup d'entre eux sont aspécifiques puisqu'ils sont retrouvés suite à l'administration de nombreux traitements anticancéreux. Les nausées, vomissements et diarrhées restent les premiers à survenir. Le risque de neutropénie avec complications infectieuses associées, d'éventuelles troubles cardiovasculaires peuvent également apparaître par la suite.

Cependant l'un des principaux effets indésirables du cétuximab est la survenue de **réactions cutanées** de type acnéiforme qui peut devenir sévère. Notamment en cas d'association avec une chimiothérapie qui pourrait potentialiser cet effet indésirable. Dans certains cas les réactions cutanées peuvent s'aggraver par une infection bactérienne à staphylocoque. Par ailleurs en fonction du stade de cet effet indésirable cutané, l'interruption ou l'arrêt définitif du traitement peut s'avérer nécessaire. Pour palier à cet effet, et d'après les recommandations de la pratique clinique, l'utilisation de tétracycline par voie orale en prophylaxie pendant 6 à 8 semaines ainsi que l'application de crème à base d'hydrocortisone à 1% en application locale avec un agent hydratant est conseillée. Il s'agit d'un effet indésirable redouté de par son impact psychologique très marqué.

Le dosage des concentrations sériques en électrolytes est recommandé avant l'instauration d'un traitement au cétuximab, ainsi que régulièrement au cours de celui-ci. Une supplémentation en électrolytes est recommandée si nécessaire, en lien avec les fréquents déséquilibres électrolytiques observés.

Par exemple, une **hypomagnésémie** qui est réversible à l'arrêt du traitement. D'autre part la survenue d'épisode diarrhéique entraîne une hypokaliémie. Et l'association du cétuximab aux dérivés des sels de platine cause fréquemment des hypocalcémies sévères.

D'autres effets indésirables comme l'élévation des transaminases ASAT et ALAT, ainsi que la survenue de conjonctivites sont fréquemment observées.

VI. EXPERIMENTATION

a. Introduction

Le cétuximab est un anticorps monoclonal anti-EGFR possédant l'AMM pour le cancer colorectal métastatique et le cancer épidermoïde de la tête et du cou en association avec la chimiothérapie. Cet anticorps monoclonal chimérique IgG1 bloque le récepteur extracellulaire EGFR1 de nombreuses cellules. De plus il a été démontré l'importance du statut mutationnel du gène *KRAS*.

En effet, la présence de modification fonctionnelle au niveau de la protéine RAS empêche l'interruption de la voie de signalisation située en aval du récepteur EGF et ceci malgré le blocage du récepteur par le cétuximab.

De ce fait un test pharmacogénomique, afin de déterminer le statu *KRAS* du patient est obligatoire. Seuls les patients atteints d'un cancer avec *KRAS* sauvage sont éligibles à un traitement par cétuximab.

Toutefois la généralisation d'une telle stratégie de sélection de patients basée sur des biomarqueurs ne permet pas d'obtenir une réponse pour environ la **moitié des patients**. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'autres déterminants moléculaires de la réponse non découvert encore à ce jour ou d'une possible exposition insuffisante au médicament.

Afin d'augmenter le taux de réponse au traitement par cétuximab, de nombreuses recherches ont tenté de trouver la concentration cible associée au meilleur rapport bénéfique/risque.

Dans le but d'évaluer ce rapport le groupe Paintaud a démontré comment les valeurs de la clairance du cétuximab pourraient être prédictives de la survie, tant chez les patients atteints d'un cancer ORL que chez ceux atteints d'un cancer colorectal^{42 43}.

Ces essais cliniques sont tous en faveur de la mise en place de stratégies de surveillance thérapeutique des médicaments au lit du patient. En effet, la clairance est associée aux niveaux d'exposition du médicament, ce qui en fait un nouveau marqueur potentiel pour prévoir l'efficacité du cétuximab et adapter la posologie en cas d'exposition insuffisante au médicament chez les patients.

b. Méthodes analytiques

1. ELISA

A ce jour, nous avons encore peu de connaissance sur la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux et le développement de méthodes bioanalytiques spécifiques pour mesurer les concentrations plasmatiques chez les patients de routine reste un défi depuis des années.

La plupart des méthodes actuellement utilisées, que ce soit dans le cadre d'essais cliniques d'enregistrement ou d'études académiques, sont basées sur des immuno-essais tels que les méthodes ELISA canoniques.

Les méthodes ELISA sont des techniques très sensibles et validées depuis déjà de nombreuses années. De ce fait, tous les rapports cliniques portant sur le cétuximab publiés à ce jour reposaient sur une mesure ELISA des concentrations plasmatiques du médicament. Cependant les techniques ELISA souffrent de nombreux inconvénients, notamment par ses procédures fastidieuses en plusieurs étapes, mais également par son manque de robustesse et de problème coût-efficacité.

En outre, seuls quelques laboratoires de pharmacocinétiques cliniques dans des centres de cancérologie ou des hôpitaux universitaires possèdent l'expertise nécessaire pour gérer correctement les procédures ELISA internes, ce qui peut limiter l'utilisation généralisée de cette technique dans le cadre du processus de suivi systématique des médicaments au chevet du patient¹³.

Les méthodes de surveillance thérapeutique doivent combiner haut débit, haute précision, simplicité et robustesse à faible coût pour les analyses d'échantillons cliniques à grande échelle. Afin de remplir les exigences de l'utilisation courante en termes de coût et d'efficacité, ainsi que de performances analytiques, une méthode de quantification bioanalytique par LC-MS/MS du cétuximab plasmatique est mise en place.

La technique d'analyse LC-MS/MS est particulièrement bien adaptée pour l'identification de protéines présentes dans un mélange complexes et la mise en évidence de modifications post-traductionnelles.

2. Matériels et méthodes

La technique d'analyse LC-MS/MS est un système qui couple chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem. Cette association offre des outils bioanalytiques très spécifiques et précis pour la surveillance thérapeutique de nombreuses substances.

La chromatographie est une technique d'analyse permettant la séparation des différents constituants d'un mélange. Les molécules à séparer vont être entraînées par un fluide, ici un liquide, celle-ci constitue la phase mobile.

Par ailleurs, les molécules vont interagir ou au contraire ne pas interagir avec un support, une matrice, fixe (solide ou un liquide fixé) qui constitue elle, la phase stationnaire.

Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe qui va permettre la séparation de ces dernières⁴⁴.

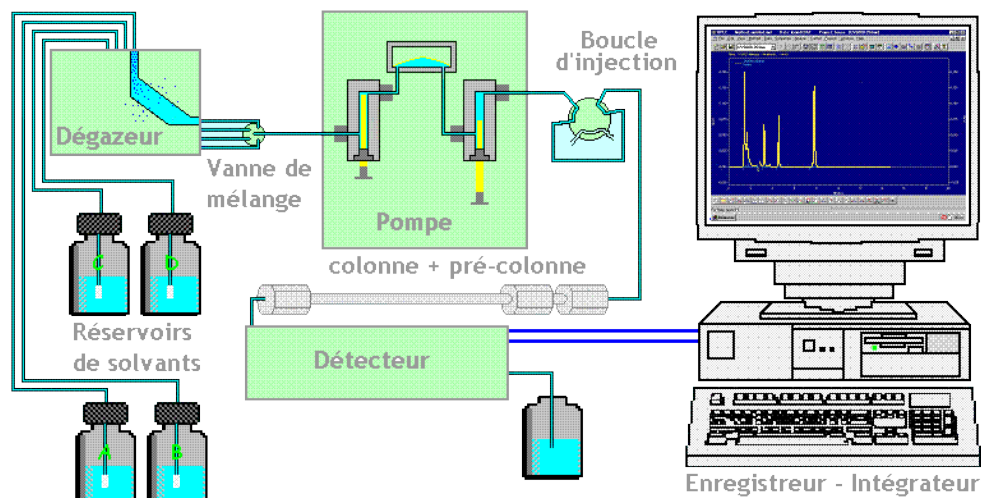


Figure 22: Système de chromatographie en phase liquide¹¹

La spectrométrie de masse quant à elle est une technique physique permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt par mesure de leur rapport masse/charge (m/z) et de caractériser leur structure chimique.

Lors d'une spectrométrie de masse, un bombardement électronique va ioniser le composé organique cible. Au cours de ce processus des ruptures des liaisons chimiques vont avoir lieu au sein de l'ion moléculaire (ou ion parent), formant des ions fils caractéristiques. Cette dissociation ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fils sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électronique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fils constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification des composés d'intérêts⁴⁵.

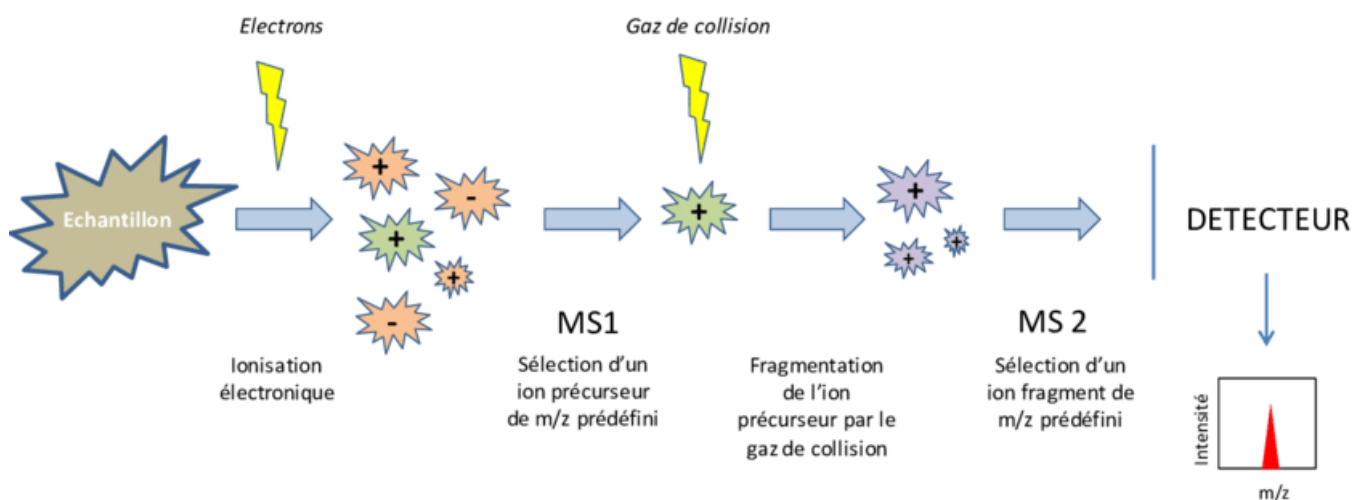


Figure 23 : Principe de la fragmentation des composés par un spectromètre de masse¹²

Suite aux recommandations relatives aux expériences protéomiques ciblées⁴⁶ c'est-à-dire l'étude des protéines cibles, la détection du cétuximab dans un échantillon est possible par identification de peptides protéotypiques du cétuximab. Ces derniers sont utilisés comme substituts de la protéine cible, l'anticorps monoclonal. Pour la quantification absolue du cétuximab au cours des applications cliniques, la spécificité a été obtenue en sélectionnant un peptide de la région variable du fragment Fab. La quantification s'est appuyée sur les deux peptides **LT3** et **HT4**, représentatifs et spécifiques des chaînes légère et lourde respectivement.¹³

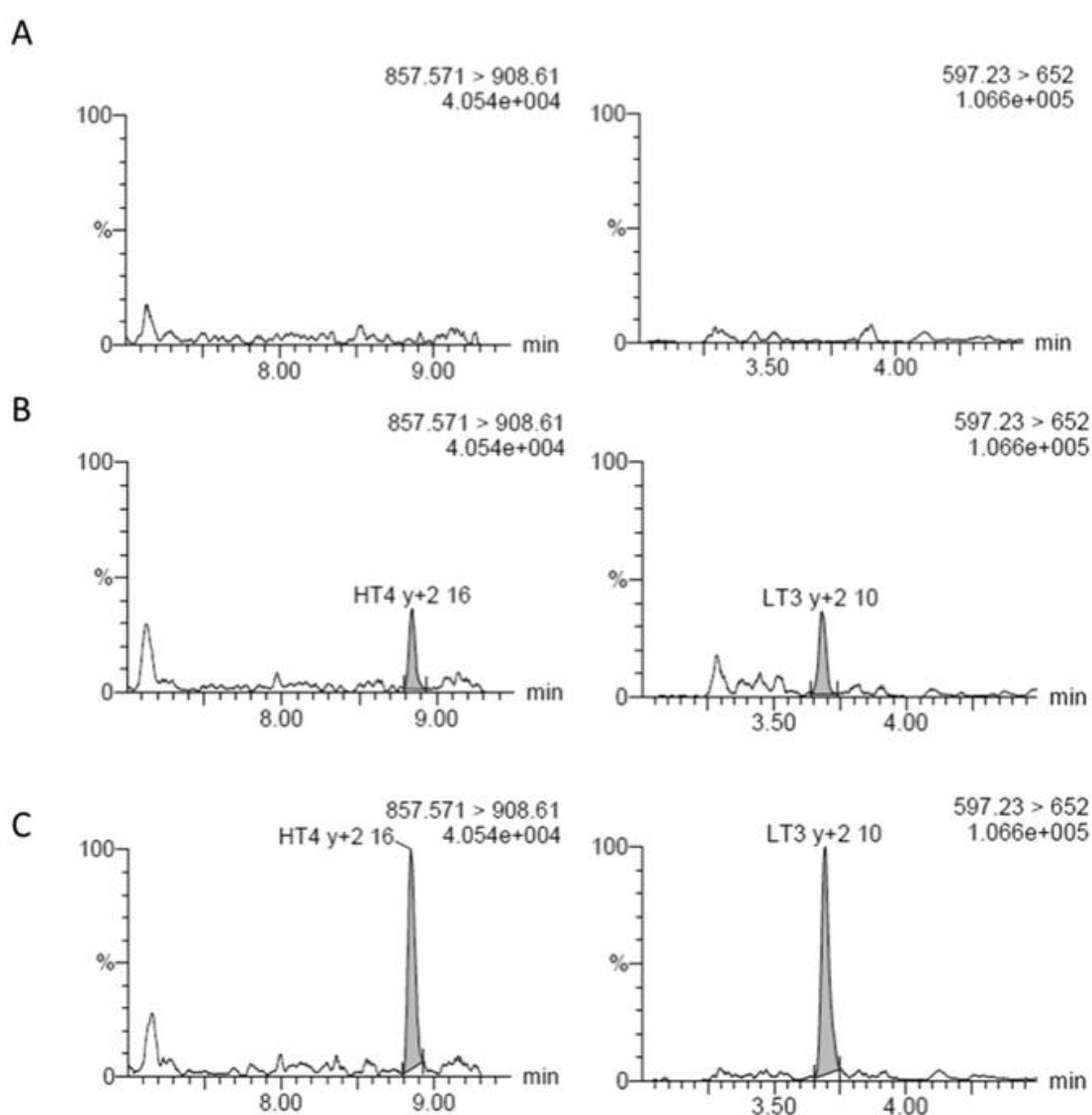


Figure 24 : Chromatogrammes de peptides HT4 (à gauche) et LT3 (à droite) illustrant le signal dans des échantillons de plasma vierges (A), la limite inférieure de quantification (B) et chez un patient avant l'administration du cétuximab (concentration résiduelle) (C)¹³

Préparation des échantillons avant analyse LC-MS

La préparation des échantillons avant l'analyse LC-MS/MS consiste en un protocole d'optimisation de digestion des protéines. C'est-à-dire que l'objectif est de fiabiliser la détection des molécules cibles.

Première étape : Précipitation des protéines

La prise d'essai est de 50 μ L de plasma. Le méthanol, le solvant acétonitrile ainsi que l'acide perchlorique ont été évalués en tant que précipitant. Les 3 réactifs ont permis une importante récupération du cétuximab. Le méthanol a été sélectionné car il permettait une re-suspension plus aisée. Le temps et la vitesse de centrifugation ont également été évalués. Une rotation courte de 5 secondes a été jugée suffisante pour une récupération robuste du cétuximab à partir du précipité.

Seconde étape : Digestion protéique

Après ajout de 40 μ g de trypsine dans l'échantillon, une d'incubation à 42°C durant 2 heures permet d'obtenir un signal robuste pour HT4 et LT3. Dans ces conditions, HT4 et LT3 ne subissent aucune dégradation peptidique.

Troisième étape : Extraction en phase solide (SPE)

Enfin une SPE permet de réduire la complexité du mélange de peptides. Le fractionnement des peptides sur des cartouches HLB fonctionnant à pH élevé a été sélectionné car il confère une séparation orthogonale à la séparation LC à pH bas.

Quatrième étape : Analyse par LC-MS/MS

Au cours de leur élution, les peptides sont transmis vers la source du spectromètre de masse, où ils sont ionisés. Les ions sont libérés par un balayage de radiofréquences et détectés par l'appareil MS.

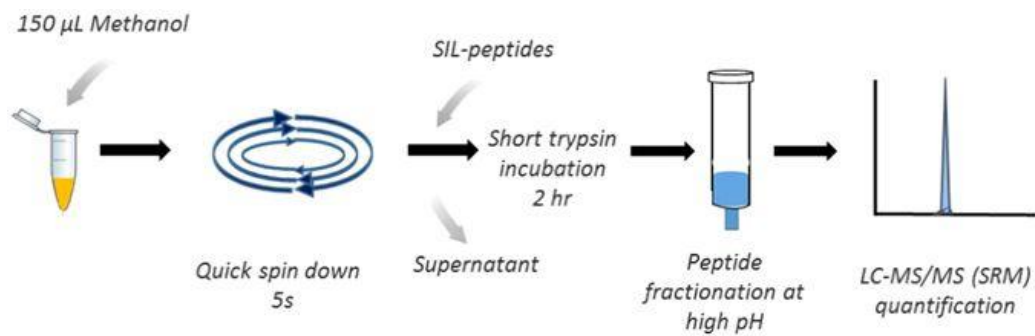


Figure 25: Protocole simplifié pour la préparation des échantillons avant l'analyse LC-MS/MS¹³

c. Étude Pilote préliminaire

Au cours de cette étude pilote la réponse des patients au traitement est évaluée par tomodensitométrie. Le seul critère d'inclusion des patients pour cette étude est qu'ils aient tous signés un consentement éclairé pour un traitement par cétuximab dans le cadre d'un cancer ORL.

Un total de 25 patients a été inclus comprenant 22 hommes et 3 femmes d'un âge moyen de 69 ans (extrêmes 48–85). Ces patients sont hospitalisés dans le service d'Oncologie Médicale du CHU La Timone à Marseille. On retrouve 7 cancers de la bouche ; 4 larynx ; 4 oropharynx ; et 10 patients ayant un cancer localisé sur une autre zone de la sphère ORL. Toutefois, cette diversité n'a pas été un facteur de confusion dans cette étude pilote. Tous les patients ont été traités par un schéma thérapeutique contenant du cétuximab entre décembre 2015 et juin 2016¹³.

De par l'importance du statut mutationnel *KRAS*, tous les patients ont préalablement subi des tests pharmacogénétiques afin de déterminer leur admissibilité au traitement par cétuximab.

Neuf patients avaient un cancer localement avancé et 4 patients présentaient une maladie métastatique. Cinq patients avaient déjà été traités par radiothérapie, et neuf patients avaient déjà reçu au moins une ligne de chimiothérapie cytotoxique.

Tous les patients ont signé un consentement éclairé avant le prélèvement supplémentaire de deux échantillons de sang afin de mesurer les niveaux de cétuximab, et le comité d'éthique local (*L'approbation du Comité de protection des personnes Sud-Méditerranée*) a été obtenu avant le début de l'étude. Toutes les expériences ont été menées conformément aux directives en vigueur. L'analyse bioanalytique du cétuximab a été réalisée dans un laboratoire soumis à la norme ISO15189. La collecte des paramètres cliniques (efficacité, toxicité) a été réalisée conformément aux directives standard en oncologie (recommandations RECIST 1.0 et CTCAE V3.0, respectivement).

Conformément aux recommandations standard de l'HAS, les patients atteints d'un cancer ORL avec un statut mutationnel *KRAS* sauvage, ont reçu une administration de cétuximab de 250 mg/m² par semaine. Cette administration de cétuximab était associée à un dérivé du platine (cisplatine ou carboplatine), ainsi qu'à du 5-FU (5-fluorouracil). Un patient a reçu du paclitaxel plutôt que le doublet dérivé du platine/5-FU. De plus, sept patients ont reçu une radiothérapie concomitante.

L'échantillonnage a été réalisé après l'administration d'au moins quatre cycles de chimiothérapie afin d'atteindre l'état d'équilibre, soit environ 2 mois de traitement. Deux échantillons de sang ont été prélevés sur tubes héparinate de Li :

- Le premier immédiatement **avant l'administration** de cétuximab → C_{min} (concentration minimale).
- Le second immédiatement **après la fin de la perfusion** afin de déterminer le C_{max}, soit la concentration maximale atteinte.

La toxicité a été surveillée de manière prospective conformément aux critères de terminologie commune des événements indésirables V3.0 (CTCAE). De la même manière trois mois après l'introduction du cétuximab l'efficacité a été évaluée selon la norme RECIST 1.0.. En raison de la petite taille de l'échantillon et du gain statistique, l'évaluation de l'efficacité du traitement a été divisée en deux groupes distincts selon des critères composites.

D'une part les patients non répondeurs c'est-à-dire les patients avec une pathologie en progression et d'autre part les patients présentant un bénéfice clinique, cela comprend les patients avec une maladie stable, réponse partielle, ainsi que les patients en réponse complète¹³.

Lors de l'évaluation et d'après la norme RECIST 1.0 ; 10 patients sur 25 (soit 40%) avaient une maladie évolutive. Les 15 patients restants (60%) ont été regroupés et classés comme patients avec bénéfice clinique :

- ⇒ maladie stable: 5 patients (20%)
- ⇒ réponse partielle: 7 patients (28%),
- ⇒ réponse complète: 3 patients (12%)

Neuf patients sur 25 sont décédés pendant la période d'observation. Parmi les patients décédés, la survie moyenne était de 11 mois à compter du début du traitement par le cétuximab¹³.

d. Survie

La présence d'une diversité de cas, aussi bien dans la localisation du cancer, les antécédents de traitement anticancéreux ou encore le stade de la maladie ainsi que la chimiothérapie associé au cétuximab pourrait laisser penser qu'ils s'agissent de facteurs de confusion au sein des résultats de l'étude. Cependant ce n'est pas le cas ici.

Par exemple, les patients atteints de maladies métastatiques se sont révélés être répartis de manière égale chez les patients non répondeurs et chez les patients présentant un bénéfice clinique.

De même, une radiothérapie concomitante ou l'utilisation de carboplatine contre l'association du cisplatine avec le 5-FU n'a pas eu d'incidence sur les résultats cliniques.

Néanmoins des niveaux d'exposition au cétuximab très variables au sein des patients ont été observés. Les concentrations minimales se situent entre 0 et 74,6 µg/ml, alors que les concentrations maximales étaient comprises entre 65,1 et 201,6 µg/ml.

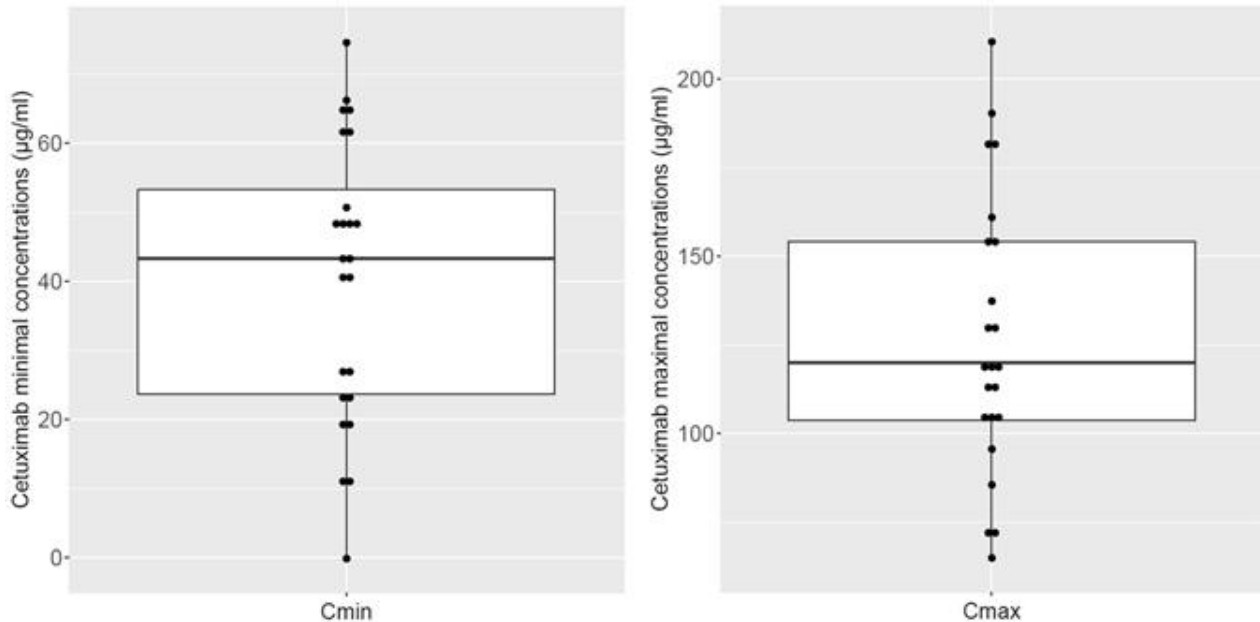


Figure 26 : Dispersion des concentrations de cétuximab après la fin de la perfusion (Cmax, à droite) et immédiatement avant le début de la perfusion suivante (Cmin, à gauche)¹³

Cela démontre que, chez certains patients, les concentrations résiduelles en cétuximab sont supérieures aux concentrations maximales atteintes à la fin de la perfusion pour d'autres patients. À contrario chez certains patients, la concentration maximale s'est avérée être inférieure aux concentrations résiduelles observées ailleurs. C'est l'illustration type de la variabilité interindividuelle¹³.

La charge antigénique, l'influence des co-variables cliniques telles que l'albumine, les possibles modifications des taux de dégradation protéolytique, ou encore le sexe du patient sont des paramètres de variabilité possible de la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux, ce qui peut expliquer ces divergences au niveau des résultats recueillis.

Néanmoins il a été observé que les taux de concentration minimale et dans une moindre mesure, de concentration maximale étaient plus élevés chez les patients présentant un bénéfice clinique plutôt que chez les patients en progression. Cela nous amène à lier l'efficacité du traitement à la pharmacocinétique du cétuximab.

Surveillance thérapeutique des médicaments et relations exposition-pharmacodynamique

À l'équilibre, les concentrations résiduelles moyennes de cétuximab étaient de $40,3 \pm 20,3$ $\mu\text{g/ml}$ et les concentrations maximales moyennes de cétuximab étaient de $126,9 \pm 39,6$ $\mu\text{g/ml}$. Cependant lors de la comparaison des différents niveaux d'exposition chez les patients présentant un bénéfice clinique avec celui de patients non répondeurs, aucune différence statistiquement significative n'a pu être observée dans les deux concentrations résiduelles ainsi que les concentrations maximales de cétuximab.

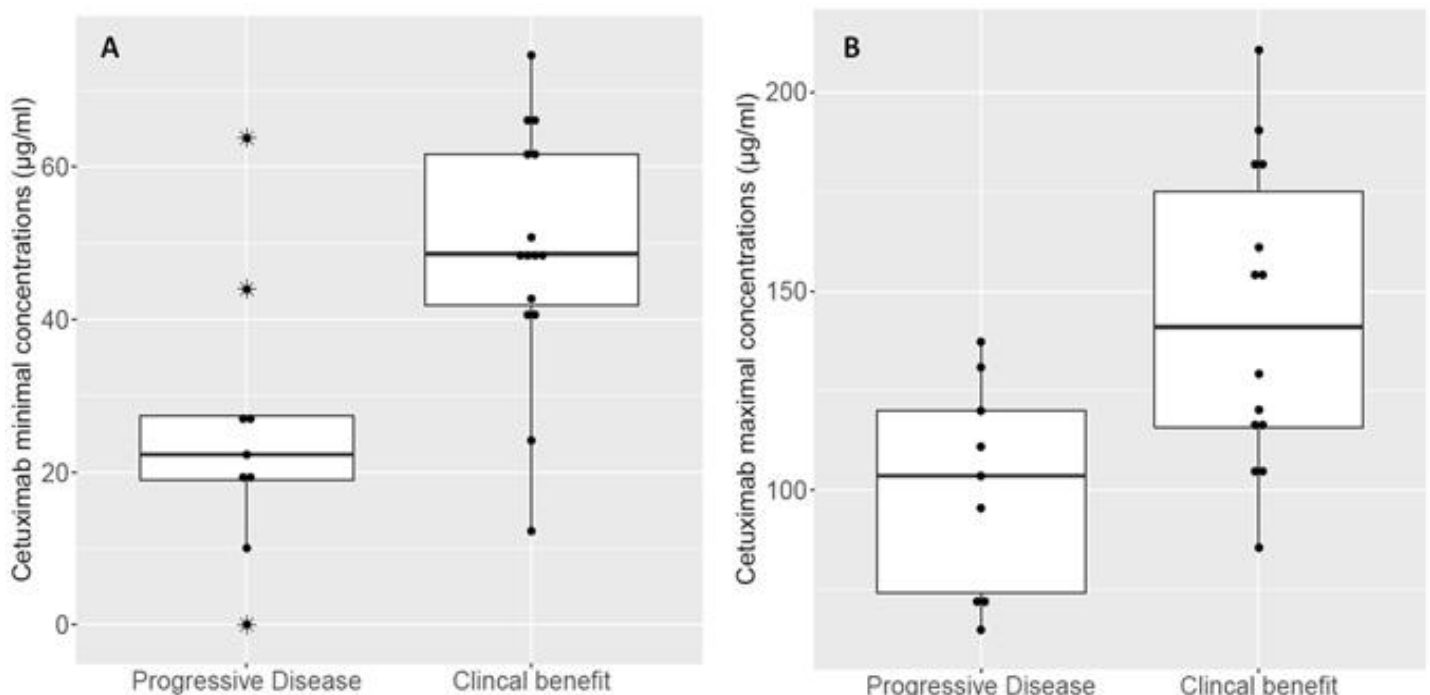


Figure 27: Des boîtes à moustaches comparant les niveaux d'exposition au cétuximab chez les patients en fonction du résultat clinique¹³

Une analyse ROC a montré que 33,8 µg/ml était le seuil de concentration minimale associé à une probabilité de bénéfice clinique avec 78% de spécificité et 87% de sensibilité. En utilisant ce seuil, 9 patients (soit 36%) appartiennent au groupe à faible concentration minimale, tandis que 16 patients (soit 64%) appartiennent au groupe à taux élevé de concentration minimale.

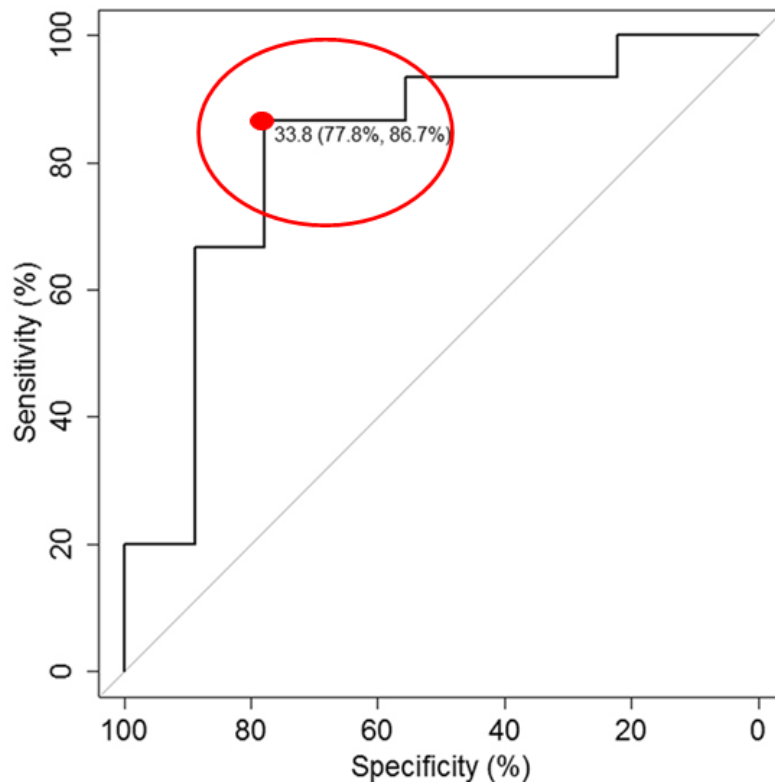


Figure 28: Courbe de l'analyse ROC avec sensibilité à 86% et spécificité à 78%¹³

Concernant les concentrations de cétuximab à Tmax, l'analyse ROC sur les valeurs de concentration maximales a défini une concentration maximale cible de 113,2 µg/ml associée à un bénéfice clinique, mais avec une spécificité de 79% et une sensibilité de 67% seulement.

De plus, le test Exact Fisher a confirmé que le seuil de concentration minimale de 33,8 µg/mL était significativement associé au bénéfice clinique (odds ratio 18,6; intervalle de confiance à 95% de 1,9 à 327,8, $p = 0,003$), mais cette association n'a pas été statistiquement confirmée pour la concentration maximale (rapport de cotes 6,6, intervalle de confiance à 95%: 0,8–71,9, $p = 0,07$). Aucune différence statistique n'a été observée entre les patients présentant une toxicité sévère et ceux n'ayant aucune toxicité¹³.

Le test Exact de Fischer n'est pas significatif pour les valeurs de la concentration maximale, alors qu'il est significatif pour la concentration minimale, cela nous amène à considérer que les concentrations résiduelles (niveaux minimaux) pourraient constituer un seuil plus pertinent à respecter pour obtenir un bénéfice clinique éventuel.

Il a été observé au cours de cette étude :

- ✓ une survie globale à 32 mois
 - ⇒ 35% de patients vivants si $C_{min} > 34\mu\text{g/ml}$
 - ⇒ 0% de patient vivant si $C_{min} < 34\mu\text{g/ml}$

- ✓ Une survie sans progression à 28 mois
 - ⇒ 18% de non progression si $C_{min} > 34\mu\text{g/ml}$
 - ⇒ 0% de non progression si $C_{min} < 34\mu\text{g/ml}$

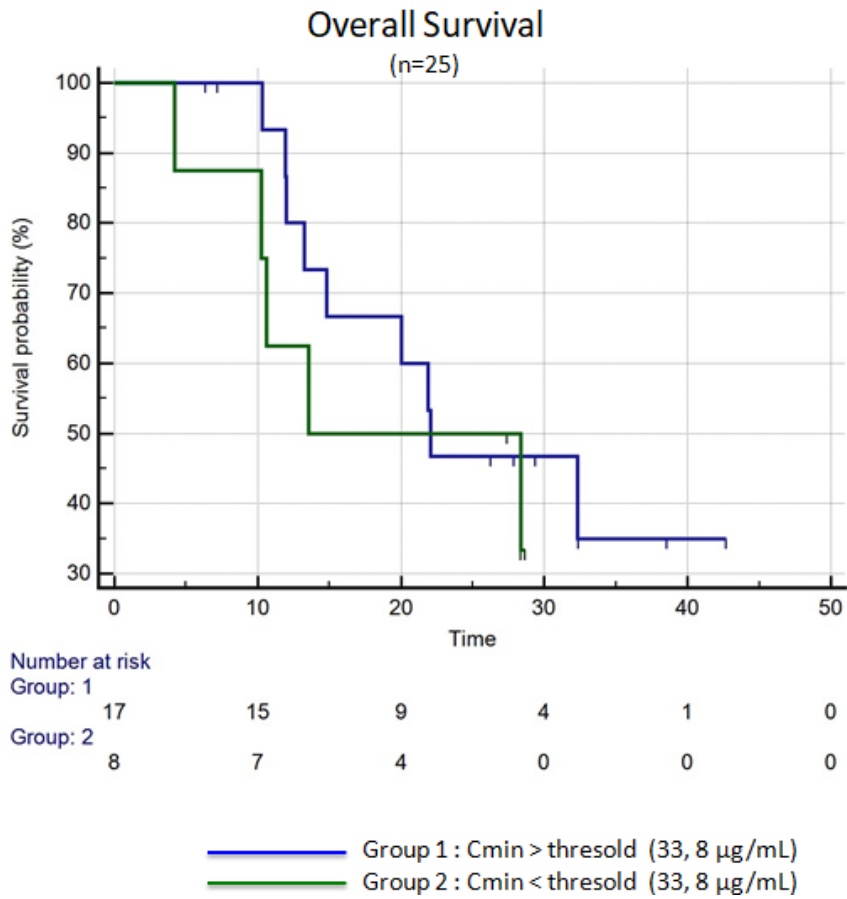


Figure 29 : Courbe Kaplan meier de la survie globale

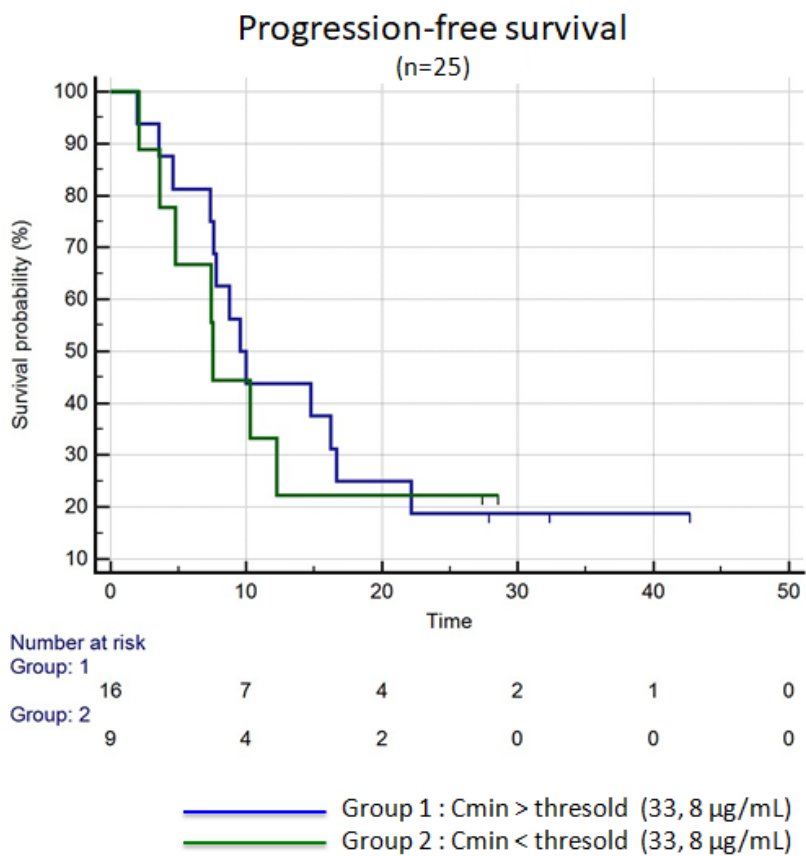


Figure 30 : Courbe Kaplan meier de la survie sans progression

Bien que devant être considérée uniquement comme une tendance sans signification statistique, cette observation correspond à l'impact positif qui a été mis en évidence entre des concentrations résiduelles de cétuximab plus élevées et l'efficacité clinique.

Le fait que la concentration minimale résiduelle puisse être une valeur plus critique que celle de la concentration maximale dans l'efficacité thérapeutique d'un traitement à base de cétuximab est en accord avec les relations pharmacocinétique/pharmacodynamique de la plupart des anticorps monoclonaux utilisés pour traiter les tumeurs solides.

VII. CONCLUSION

Les anticorps de par leur poids moléculaire important par rapport aux traitements anticancéreux classiques, pénètrent difficilement dans les tumeurs solides et il est donc généralement admis que seules les cibles extracellulaires de la couche cellulaire externe de la masse tumorale seront plus facilement accessibles au fil du temps. En particulier avec le cétuximab, des modèles expérimentaux ont déjà montré que la distribution diminuait avec l'éloignement des vaisseaux sanguins et que peu d'anticorps se trouvaient dans les régions hypoxiques notamment les régions où l'on retrouve les noyaux tumoraux.

Par conséquent, plutôt que d'atteindre des valeurs de concentration plasmatique maximale élevée nécessitant l'administration d'importantes quantités de cétuximab qui ne pourront pas pénétrer dans les tissus tumoraux profonds, assurer une inhibition constante des cibles d'EGFR disponibles à la surface de la tumeur avec des niveaux creux soutenus est probablement un meilleur moyen de maximiser l'efficacité du traitement par le cétuximab dans les cancers ORL¹³.

Dans cette étude, tous les patients présentaient un statut mutationnel de type sauvage au niveau du gène *KRAS*, ce qui théoriquement devait leur permettre de répondre au traitement anti-EGFR. Cependant, 40% d'entre eux présentaient une maladie évolutive malgré un profil pharmacogénomique favorable. Les données de l'étude suggèrent ainsi que les concentrations résiduelles en cétuximab inférieures à 34 µg/ml devraient probablement être adaptées à la hausse, de manière à augmenter les niveaux d'exposition afin améliorer l'efficacité et optimiser les taux de réponses des patients traités.

Il est à noter qu'aucune relation de ce type n'a été mise en évidence avec des événements toxiques. À cet égard, le fait qu'aucune relation n'ait pu être démontrée ici entre les niveaux d'exposition au cétuximab et les effets indésirables liés au traitement ne permet pas de conclure à l'existence d'un tel lien.

Ceci s'explique par le nombre limité de patients inclus dans cette étude préliminaire et du fait qu'ici, aucune toxicité typique liée au cétuximab comme l'hypomagnésémie ou encore la survenue d'une toxicité cutanée largement répandue, n'a été enregistrée pour vérifier cette hypothèse.

Enfin, le nombre de patients inclus dans cette étude pilote et la durée de la période d'observation sont relativement faibles pour permettre une évaluation correcte de la survie. Il serait donc recommandé de réaliser une étude sur un effectif plus important pour obtenir des résultats plus significatifs.

Cette nouvelle étude pourrait utiliser la pharmacocinétique comme marqueur d'efficacité et permettre de légitimer l'administration du cétuximab à des doses adaptées pour chaque patient dans les cancers ORL.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Les étapes de la cancérisation. *ResearchGate* Available at: https://www.researchgate.net/figure/Les-etapes-de-la-cancerisation_fig1_323334601. (Accessed: 7th April 2019)
2. DHYEVRE MARION Education thérapeutique des patients atteints de cancer : Les thérapies ciblées, le diagnostic moléculaires et les essais cliniques d'individualisation thérapeutique expliqués à l'officine 2014.pdf
3. Plateformes de génétique moléculaire : missions et localisation - Les plateformes de génétique moléculaire des cancers. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers/Missions-et-localisation-des-plateformes>. (Accessed: 6th April 2019)
4. Thérapies ciblées : modes d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie spécifique. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Therapies-ciblees-modes-d-action>. (Accessed: 31st March 2019)
5. Anticorps et technologies en développement | Innate Pharma. Available at: <https://www.innate-pharma.com/fr/anticorps-et-technologies-en-developpement>. (Accessed: 6th April 2019)
6. Département de pharmacie - ppt video online télécharger. Available at: <https://slideplayer.fr/slide/5392734/>. (Accessed: 6th April 2019)
7. pharmaco-therapies-ciblees-j-ciccolini.pdf.
8. Dr Francois Ghiringhelli Centre Georges Francois Leclerc Dijon - ppt video online télécharger. Available at: <https://slideplayer.fr/slide/2728853/>. (Accessed: 6th April 2019)
9. BUFFET CAMILLE Anomalies moléculaires de la voie MAPK e cancer papillaire de la thyroïde : étude de deux phosphatases spécifiques de ERK, DUSP5 et DUSP6 2015.
10. Lièvre, A. & Laurent-Puig, P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro digest II*,
11. ATEM - Chromatographie - Phase Liquide - Le principe - Université Lille 1. Available at: <http://atechimie.univ-lille1.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/Principe/>. (Accessed: 6th April 2019)
12. Principe de la fragmentation des composés par un... *ResearchGate* Available at: https://www.researchgate.net/figure/Principe-de-la-fragmentation-des-composes-par-un-spectrometre-de-masse-MS-en-tandem_fig5_291147739. (Accessed: 5th April 2019)
13. Becher, F. *et al.* A simple and rapid LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients. *Sci Rep* **7**, 2714 (2017).
14. Wheeler, D. L., Dunn, E. F. & Harari, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors—impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 493–507 (2010).
15. Epidémiologie des cancers - Les chiffres du cancer en France. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>. (Accessed: 31st March 2019)
16. Plan cancer 2014-2019 : priorités et objectifs - Plan cancer. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>. (Accessed: 31st March 2019)
17. CISMef. CISMef. Available at: <http://www.chu-rouen.fr/page/techniques-de-diagnostic-moleculaire>. (Accessed: 7th April 2019)

18. MERLIN, J.-L. *Les biomarqueurs moléculaires en oncologie*. (2014).
19. Haute Autorité de Santé - Cancer du poumon. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1518075/en/cancer-du-poumon. (Accessed: 6th April 2019)
20. RAYMOND, E. *Le concept de cible en cancérologie*. (John Libbey Eurotext, 2009).
21. Djuric, S. W., Akritopoulou-Zanze, I., Cox, P. B. & Galasinski, S. Chapter 25 - Compound Collection Enhancement and Paradigms for High-Throughput Screening — an Update. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (ed. Macor, J. E.) **45**, 409–428 (Academic Press, 2010).
22. La médecine de précision - Comprendre la recherche. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Comprendre-la-recherche/La-medecine-de-precision>. (Accessed: 31st March 2019)
23. ROBERT, J. *Bases biologiques de la cancérologie Signalisation cellulaire et cancer*. (Meddecine-Science, 2017).
24. Glivec nouvelle indication dans le traitement adjuvant des patients adultes présentant un risque significatif de rechute après résection d'une tumeur stromale gastro-intestinale GIST Kit (CD117) positive aln.editions Cancero_dig_2009_3_220_225.pdf.
25. AZRIA, D. & SPANO, J.-P. *Thérapie ciblée en cancérologie*. (John Libbey Eurotext, 2006).
26. Immunothérapie : mode d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie spécifique. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Immunotherapie-mode-d-action>. (Accessed: 31st March 2019)
27. MERLIN, J.-L. Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie. *La Lettre du Pharmacologue* **22**, (2008).
28. TREDANIEL, J. *Les médicaments des cancers : Une pratique des médicaments à nos dispositions*. (ESKA, 2013).
29. J_ALEXANDRE_Notions_PK_de_base.pdf.
30. Etapes du devenir du médicament. Available at: <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique-et-variabilite-de-reponse-au-medicament/36-etapes-du-devenir-du-medicament>. (Accessed: 7th April 2019)
31. STANKE_LABESQUE_Francoise_Aspets pharmacocinétiques 2011/2012.pdf.
32. Paintaud, G. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux. *médecine/sciences* **25**, 1057–1062 (2009).
33. Suivi thérapeutique des thérapie ciblée anti-angiogéniques : la pharmacocinétique est-elle le biomarqueur oublié?
34. Dua, P., Hawkins, E. & van der Graaf, P. A Tutorial on Target-Mediated Drug Disposition (TMDD) Models. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **4**, 324–337 (2015).
35. PAINTAUD Gilles et al. Biothérapies : des médicaments comme les autres ? EDP Sciences 2007.
36. Fracasso, P. M. *et al.* A Phase 1 Escalating Single-Dose and Weekly Fixed-Dose Study of Cetuximab: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Rationale for Dosing. *Clin Cancer Res* **13**, 986–993 (2007).
37. Cohen, S. J., Cohen, R. B. & Meropol, N. J. Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5374–5385 (2005).
38. Hubert, P. [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer* **94**, F137-145 (2007).
39. Spindler, K.-L. G. *et al.* Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. *Anticancer Res.* **26**, 4889–4893 (2006).
40. Lièvre, A. *et al.* KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374–379 (2008).

41. VIDAL - Cétuximab. Available at: <https://www.vidal.fr/substances/22623/cetuximab/>. (Accessed: 7th April 2019)
42. Azzopardi, N. *et al.* Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6329–6337 (2011).
43. Pointreau, Y., Azzopardi, N., Ternant, D., Calais, G. & Paintaud, G. Cetuximab Pharmacokinetics Influences Overall Survival in Patients With Head and Neck Cancer. *Ther Drug Monit* **38**, 567–572 (2016).
44. Chromatographie liquide liquid chromatography HPLC Enseignement et recherche Biochimie Emmanuel Jaspard Université Angers biochimej. Available at: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/1Chromatographie.htm>. (Accessed: 7th April 2019)
45. Magniez, M. La spectrométrie de masse. *biotechnologie* Available at: <http://www.technobio.fr/article-la-spectrometrie-de-masse-51092779.html>. (Accessed: 5th April 2019)
46. Picotti, P. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature Methods* **9**, 555–566 (2012).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.