Polymorphismes et traitements néoadjuvants des cancers du sein : efficacité du docétaxel et polymorphisme d'ABCB1/MDR1

Joseph Gligorov

▶ **To cite this version:**

Joseph Gligorov. Polymorphismes et traitements néoadjuvants des cancers du sein : efficacité du docétaxel et polymorphisme d'ABCB1/MDR1. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066082 . tel-00829467

HAL Id: tel-00829467

https://theses.hal.science/tel-00829467

Submitted on 3 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Sciences de la vie
ED 394 : Physiologie et physiopathologie

Présentée par

M. Joseph GLIGOROV

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Polymorphismes et traitements néoadjuvants des cancers du sein : Efficacité du docétaxel et polymorphisme d'ABCB1/MDR1.

soutenue le vendredi 13 avril 2012

devant le jury composé de : (préciser la qualité de chacun des membres).

Mr	le Professeur Jean-François Bernaudin	Directeur de thèse
Mme	le Professeur Frederique Penault-Llorca	Rapporteur
Mr	le Professeur Gérard Milano	Rapporteur
Mr	le Professeur Michel Marty	Examinateur
Mr	le Professeur Jacques Robert	Examinateur

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Au Professeur Jean-François BERNAUDIN qui m'a confié ce projet et épaulé pendant sa réalisation. Il restera pour moi un exemple de cette interrogation biologique née de l'observation clinique.

Aux docteurs Anne FAJAC, François LOKIEC, Martine ANTOINE et Pierre LEVY. Je les remercie de leur aide, sans laquelle ce travail n'aurait pu voir le jour. Ils sont l'illustration de la transversalité et de l'interactivité de nos disciplines.

Aux Professeurs Frédérique PENAULT-LLORCA et Gérard MILANO qui m'ont fait l'honneur d'examiner et évaluer ce travail. Leurs conseils m'ont été des plus précieux et je les remercient de l'intérêt qu'ils ont porter à ce travail et son amélioration.

Aux Professeurs Jacques ROBERT et Michel MARTY dont j'ai lu les écrits avant d'avoir l'honneur et le plaisir de les rencontrer. Je les remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur Victor IZRAEL qui le premier m'ouvrit les portes de la cancérologie qui ne se sont pas refermés depuis. Vous aviez raison, on ne peut en sortir une fois entrés...

Au Professeur Jean-Pierre LOTZ qui m'a accompagné toutes ces années en me faisant confiance. Rares sont ceux qui dirigent en laissant libre. Il en fait partie.

A mes collègues et amis qui ont supportés mes efforts, mes doutes, mes colères et mes angoisses.

A ces Patients qui ont bien voulus me confier leurs espoirs.

A ma famille et plus particulièrement mon épouse Gaëlle et nos enfants Marie, Elisa et Ivan sans qui je n'aurai pas pu avancer. Vous m'avez appris beaucoup mais avant tout l'importance de la relativité. *Le temps est si long loin de vous et si court à vos cotés*.

Sommaire

1.Introduction			**5**
	1.1. Pharmacogénétique et cancers		**7**
		1.1.1. Polymorphismes : définition générale	**10**
		1.1.2. Pharmacogénomique des anticancéreux	**13**
		1.1.2.1. Mutations germinales et réponses aux traitements anticancéreux	**13**
		1.1.4. Mutations somatiques et réponses aux traitements anticancéreux	**16**
	1.2. Pharmacologie des taxanes		**17**
		1.2.1. Mécanismes d'action	**18**
		1.2.2. Pharmacocinétique	**22**
		1.2.3. Métabolisme et Pharmacodynamie	**27**
	1.3. ABCB1/MDR1		**30**
		1.3.1. Transporteurs ABC : homologies et importance en cancérologie	**32**
		1.3.2. ABCB1	**41**
		1.3.2.1. ABCB1, du gène à la protéine	**41**
		1.3.2.2. ABCB1, localisation et fonctions	**45**
		1.3.2.3. Polymorphismes d'ABCB1	**49**
		1.3.3. ABCC1, ABCG2	**53**
	1.4. Chimiothérapie néoadjuvante et cancers du sein		**55**
		1.4.1. Principes de la chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein	**55**
		1.4.2. Les agents utilisés	**57**
		1.4.3. Evaluation de l'action	**64**
		1.4.4. Bénéfices et intérêts	**68**
2. Expérimentation			**71**
	2.1.	**Objectifs de l'étude**	**72**
	2.2.	**Protocole**	**74**
		2.2.1. Choix du plan d'expérimentation-justification	**74**
		2.2.1.1. Choix du protocole de chimiothérapie (doxorubicine/docétaxel)	**74**
		2.2.1.2. Évaluation de la réponse aux anthracyclines/taxanes	**74**
		2.2.1.3. Génotypage du gène *MDR1*	**75**
		2.2.1.4. Pharmacocinétique des agents anti-cancéreux (doxorubicine/docétaxel)	**76**

		2.2.1.5. Nombre prévu de personnes-justification	77
		2.2.1.6. Durée de participation et d'exclusion des patientes dans le cadre d'un protocole sans bénéfice direct	78
		2.2.2. Schéma de la conduite de la recherche	79
		2.2.2.1. Critères de sélection des patientes	79
		2.2.2.2. Étapes avant la chimiothérapie	80
		2.2.2.3. Pendant la première cure de chimiothérapie : étude pharmacocinétique	80
		2.2.2.4. Après la fin des 4 cures de doxorubicine	81
		2.2.2.5. Pendant la première cure de docétaxel : étude pharmacocinétique	81
		2.2.2.6. Après la fin de la chimiothérapie et avant l'intervention chirurgicale	81
		2.2.2.7. Étude anatomopathologique	81
		2.2.2.8. Critères d'évaluation	83
		2.2.2.9. Gestion des données statistiques	86
	2.3.	Description de la population de l'étude	88
	2.4.	Résultats concernant le taux de réponse complète histologique	91
	2.5.	Résultats concernant l'étude des polymorphismes d'ABCB1	93
	2.6.	Présentation des articles	94
		2.6.1. Mise au point sur la pharmacologie des taxanes (article 1)	94
		2.6.2. Corrélation entre polymorphisme d'ABCB1/MDR1 et pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel (article 2)	101
		2.6.3.Corrélation entre polymorphisme d'ABCB1/MDR1 et réponse au traitement néoadjuvant par doxorubicine et docétaxel (article 3)	111
3. Discussion et perspectives			139
	3.1.	Validité du modèle clinique utilisé	141
	3.2.	Importance du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel	143
	3.3.	Importance du statut hormonal sur le métabolisme du docétaxel	149
	3.4.	Possibles paramètres confondants l'analyse de l'importance d'ABCB1 dans le métabolisme du docétaxel	153
	3.5.	Perspectives	155
4. Références bibliographiques			148

1. Introduction

« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »

Aristote (384-322 av JC) *in Metaphysique*

Au cours de l'histoire, la définition des cancers, et du cancer du sein en particulier, n'a été que le reflet des modifications profondes de la pensée médicale portée successivement par la philosophie, l'anatomie, l'histologie et maintenant la biologie et ses avancées technologiques. C'est ainsi qu'au cours du temps ces maladies furent d'abord considérées comme des maladies systémiques et leur origine locale ne fut établie qu'au XVIIIème siècle. Par la suite, la mise en évidence de leur potentiel évolutif locorégional et la diffusion à différents tissus et organes amena Bichat à établir une théorie « tissulaire » qui évolua au milieu du XIXème siècle vers la théorie cellulaire[1]. De nos jours un nouveau cadre nosologique s'ouvre vers une reclassification des cancers, qui dépasse celle d'une maladie d'organe mais des anomalies spécifiques biologiques expliquant que nous ne soyons plus en présence « du » mais « des » cancers, comme c'est le cas dans les cancers du sein[2].

Les traitements ont parallèlement évolué avec les concepts évoqués ci-dessus et c'est ainsi qu'en plus des traitements locorégionaux que sont la chirurgie et la radiothérapie potentiellement curateurs à eux seuls (pour les tumeurs malignes non hématologiques) sont venus s'ajouter des traitements systémiques chimiques.

Si le terme de chimiothérapie correspond à l'usage de certaines substances chimiques pour traiter une maladie, nous retiendrons pour la suite de ce travail son sens courant actuel correspondant à l'utilisation de certains traitements chimiques « non ciblés » du cancer.

Toutefois il est également nécessaire de préciser qu'au sens courant de ce terme, la chimiothérapie correspond en effet à l'ensemble des substances chimiques cytotoxiques ayant une action antimitotique que ce soit sur les cellules cancéreuses ou les cellules normales. Cette définition sous-entend donc une action non spécifique expliquant en général les toxicités de ces agents sur les cellules normales à temps de doublement rapide. Cette terminologie exclut donc du cadre nosologique des chimiothérapies les thérapies « dites » ciblées, visant une caractéristique plus courante de certaines cellules cancéreuses comme les récepteurs à certains stéroïdes ou l'expression de récepteurs à des facteurs de croissance témoignant parfois d'une « addiction » de ces cellules à une voie de signalisation ou un oncogène plus spécifique.

Le père du concept de la chimiothérapie moderne du point de vue pharmacologique est Paul Ehrlich qui avec son disciple Sahachiro Hata découvrit, en 1908, l'arsphénamine, un composé d'arsenic initialement utilisé pour traiter la syphilis et la trypanosomiase. Mais c'est à la fin de la seconde guerre mondiale que débute l'histoire de la chimiothérapie actuelle et son évaluation puis son utilisation clinique d'abord en hématologie puis pour le traitement des tumeurs solides et notamment le cancer du sein[3].

La multiplication des armes thérapeutiques a naturellement amené à se poser la question de la stratégie thérapeutique utilisant ces différentes approches et notamment leur importance et leur positionnement pour l'obtention d'une guérison ou d'un allongement du nombre d'années de vie gagnées sur la maladie. Puisque les techniques chirurgicales permettaient d'assurer à elles seules la guérison de nombreux patients en situation non métastatique, tout traitement systémique visant à réduire le risque de récidive fut appelé *adjuvant* et tout traitement systémique utilisé avant la chirurgie fut ainsi dénommé *néoadjuvant* ou *« premier ».*

Allant de pair avec l'évolution des stratégies thérapeutiques la meilleure compréhension de l'intérêt des traitements et notamment des chimiothérapies passe non seulement par la compréhension des mécanismes d'action mais encore plus par celle des mécanismes de résistance. Dans ce dernier cas deux approches complémentaires existent.

- L'une portant sur la compréhension des mécanismes de résistance liés à la cellule cancéreuse elle-même et témoignant soit de l'hétérogénéité tumorale initiale soit de son adaptabilité par une pression de sélection liée à l'exposition aux différents traitements.
- L'autre portant sur la compréhension des mécanismes de résistance liés à l'hôte et plus particulièrement au devenir du médicament anticancéreux entre le moment ou il est administré et celui ou il atteint sa cible.

C'est cette seconde option que nous avons choisi de mettre en œuvre au sein d'un projet de recherche de transfert visant à explorer et comprendre le lien qu'il existe entre efficacité ou résistance à un traitement de chimiothérapie et les données pharmacologiques de pharmacocinétique et de pharmacogénétique appliquées à l'étude de l'impact thérapeutique du docétaxel en situation néoadjuvante dans le cancer du sein.

1.1. Pharmacogénétique et cancers

Au sein des différentes classes thérapeutiques, les anticancéreux et plus particulièrement les agents cytotoxiques « non ciblés » communément nommés chimiothérapies représentent probablement les médicaments dont l'index thérapeutique est parmi les plus faibles, puisque le développement même de ces médicaments repose sur la détermination de la dose maximale tolérable dans les essais de phase I, servant au développement ultérieur du médicament.
Plusieurs paramètres influencent cet index thérapeutique en expliquant la variabilité inter-individuelle de la réponse ou la toxicité à un traitement particulier. Cette variabilité entrainant des modifications de la pharmacocinétique ou de la pharmacodynamique du médicament peut-être liée :

- à des états physiologiques particuliers : nouveau-nés, enfant, femmes enceintes, ménopause, grand âge
- à des comorbidités : insuffisance rénale, insuffisance hépatique
- à des facteurs environnementaux : tabagisme, alimentation
- à des facteurs génétiques.

Certaines comorbidités et états physiologiques sont habituellement pris en compte au moment du développement préclinique ou clinique initial du médicament afin de permettre une optimisation des modalités de prescription dans des situations particulières mais possiblement fréquentes[4]. Certains facteurs environnementaux commencent à être pris en compte concernant certaines précautions d'utilisation de médicaments. On notera parmi les plus courants, la notification de produits alimentaires ou de médicaments pouvant interagir avec les cytochromes P450 (jus de pamplemousse et inhibition du CYP3A4, nicotine et inhibition du CYP2A6 ou anti sérotoninergiques et inhibition du CYP2D6).

C'est à la fin des années 1950 que les premières publications évoquent une origine génétique à la variabilité inter-individuelle de la réponse à un traitement[5,6]. Plus de 30 ans plus tard, ce sont les études rapportant une plus grande variabilité inter-individuelle au sein d'une population large, qu'intra-individuelle à de multiples instants différents qui firent émettre l'hypothèse de l'importance de l'héritage génétique comme un déterminant majeur de la réponse à un traitement systémique[7,8]. La pharmacogénétique était née.

Les progrès technologiques et notamment la possibilité d'explorer pour un individu son génome en partie ou en totalité pour des couts de plus en plus restreints ont ouvert des possibilités considérables en ce qui concerne l'individualisation de la prise en charge médicale[9]. Le développement de nouvelles techniques d'étude du génome a généré un nombre considérable d'informations concernant certaines variations inter-individuelles de séquences du génome (ou polymorphismes génétiques) notamment dans le domaine de la cancérologie[10]. D'autres études, partant de caractéristiques cliniques associés à certains types de cancers ont permis de montrer l'existence d'influences héréditaires sur ces phénotypes[11]. Les deux approches sont complémentaires et leur association a permis dans un certain nombre de cas d'identifier les bases moléculaires du polymorphisme de ces phénotypes, et d'établir les conséquences physiologiques de variations inter-individuelles dans la séquence du génome.

Cette approche d'étude des polymorphismes génomiques concerne également le développement et l'optimisation de l'utilisation des médicaments aboutissant à cette nouvelle entité pharmacologique : la pharmacogénomique. L'identification de gènes pathogènes, ou d'autres jouant un rôle protecteur contre le développement des maladies, est une stratégie de plus en plus fréquente d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Concernant les médicaments déjà utilisés, les enzymes impliquées dans leur transport, leur métabolisme, ou les molécules qui constituent leurs cibles pharmacologiques, peuvent également présenter des polymorphismes expliquant des différences inter-individuelles importantes de leur index thérapeutique. L'étude de ces variations peut aider à prévoir, à l'échelon de la population ou de l'individu, l'efficacité et la tolérance de certains médicaments[12].

En effet, en présence d'une dose standard de médicament, certains individus vont s'éloigner de la réponse attendue, en présentant soit une augmentation ou plus fréquemment une diminution ou une absence d'efficacité, soit des effets indésirables ou une toxicité limitante. De nombreux polymorphismes génétiques sont décrits et ils affectent plus particulièrement dans le domaine des médicaments anticancéreux les gènes[13-15]

- des enzymes ou récepteurs cibles : HER2, EGFR, Récepteurs hormonaux, VEGF
- des enzymes responsables du métabolisme des médicaments : cytochromes P450, glucuronyltransférases
- des transporteurs de médicaments : P-glycoprotéine

Le but de la pharmacogénétique est donc de déterminer les profils génétiques des individus pour dépister ceux qui présentent un risque particulier d'inefficacité ou de toxicité vis-à-vis de certains médicaments. La pharmacogénétique permettra dans un futur proche une prescription individualisée dans la pratique médicale courante afin d'optimiser les traitements médicamenteux, tant en termes d'efficacité que de sécurité d'emploi. Ces concepts sont essentiels et expliquent la part de plus en plus importante de la pharmacogénomique dans l'approche thérapeutique personnalisée et ceci notamment en cancérologie via l'étude des polymorphismes de gènes cibles du médicament[14].

1.1.1. Polymorphismes : définition générale

S'il est admis que Gregor Mendel posa les bases de la génétique il y un siècle et demi [16], le séquençage du génome humain remonte à moins de 10 ans[17] et depuis le nombre de publications concernant la génomique, les cancers et les traitements ne cesse d'augmenter de façon exponentielle. Par ailleurs, il existe un enjeu majeur quant à la connaissance des variations du génome pouvant expliquer des différences d'efficacité et/ou de toxicité de certains traitements comme ceux des cancers affectant des populations différentes[18]. Cette disparité était déjà supposée sur des données cliniques mais leur identification précise pourrait permettre de mieux développer et administrer certains traitements[19].

Au sein de l'espèce humaine, on estime que 99,5% des 3 milliards de nucléotides constituant le génome est totalement commun entre les individus[20]. La diversité ne touche donc que 0,5% de ce patrimoine mais elle est suffisante pour expliquer certaines différences, notamment en ce qui concerne les origines et les migrations humaines [21,22] ou leurs interactions avec certains agents pathogènes pouvant exercer une pression de sélection dont l'un des exemples les plus flagrants est l'émergence au sein de populations

exposées au paludisme des modifications alléliques permettant d'y résister comme le déficit en G6PD[23] ou certaines hémoglobinopathies ce qui avait été évoqué dès les années 1960[24]. On distingue ainsi au sein de l'espèce humaine 5 branches d'une origine commune africaine et qui sont dans l'ordre de migration: une branche sub-saharienne et africaine, une branche européenne, une branche asiatique, une branche américaine et une branche océanienne[22]. Pourtant, malgré l'individualisation de ces 5 groupes ethniques, la plupart des différences sont inter-individuelles et non liées à des populations[25].

Il existe ainsi dans le génome des êtres vivants des variations inter-individuelles dans la séquence d'ADN, appelées polymorphismes. Chaque gène contient ainsi un certain nombre de polymorphismes. Le plus souvent, ces polymorphismes ne modifient pas le message héréditaire (polymorphisme dit neutre) soit parce qu'ils sont situés dans des régions non codantes du génome (introns), soit parce qu'ils n'entraînent pas de modification du codon. Cependant, un polymorphisme situé dans les régions codantes ou les régions régulatrices d'un gène peut avoir des conséquences fonctionnelles pour la protéine codée par ce gène en modifiant sa structure et son activité et/ou son expression.
Un type de polymorphisme particulièrement fréquent est représenté par le polymorphisme nucléotidique ou polymorphisme d'un seul nucléotide dénommé SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Cette variation d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce est très fréquente dans le génome humain (il en existe en moyenne tous les 1000 à 3000 nucléotides)[26]. Les SNP représentent 90 % de l'ensemble des variations génétiques humaines, et deux SNP sur trois substituent la cytosine avec la thymine. Dans le cas où les SNP se retrouvent au sein des régions codantes, celles-ci ne vont pas obligatoirement modifier la séquence d'acide aminé de la protéine produite, et ce, grâce à la redondance du code génétique. Les SNP qui se retrouvent dans des régions non codantes peuvent toutefois avoir des conséquences sur l'épissage, les facteurs de transcription, ou sur les séquences d'ARN non codant[27] .
Il existe pour tous les polymorphismes génétiques une nomenclature précise et universelle : le code rs. Ils sont référencés au niveau de la base de données du NIH http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp ou http://www.SNPedia.com/. Chaque SNP comporte donc une identité comportant « rs-suivi d'un numéro ». Cette carte d'identité permet alors d'aller chercher sur les sites de nomenclature si le polymorphisme identifié est le plus fréquent ou non. Ainsi on retrouvera le nom du gène impliqué et ensuite un numéro

(correspondant au nombre de bases/nucléotides par rapport au début du gène) suivi d'une indication concernant l'allèle le plus fréquent (A, T, C ou G). Le nombre est précédé d'un signe négatif si le polymorphisme se situe en amont du début du gène. C'est toujours le même brin d'ADN qui est choisi pour caractériser le polymorphisme.

Si l'on prend le cas des deux polymorphismes de transporteurs membranaires à « ATP-Binding- Cassette » B1 (ABCB1) les plus fréquents :
- rs2032582, est aussi connu comme G2677T, Il s'agit d'un SNP non muet (code pour un acide aminé différent). La base 2677 est localisée au niveau de l'exon 21de *ABCB1*.
- rs1045642, est aussi connu comme C3435T.

Sachant que nous avons pour chaque gène au moins deux allèles (une par chromosome) en dehors chez l'homme des chromosomes sexuels différents, chaque individu peut donc être homogène ou hétérogène concernant son polymorphisme.

Les polymorphismes ayant un intérêt médical sont classés en trois catégories en fonction de leur fréquence : variants courants (5-10% dans la population générale), variants rares (<1% et très souvent au sein d'une population) et variants intermédiaires (1-5% au sein d'une ou plusieurs populations). Il paraît probable que les variants courants sont ceux existant avant le début de la migration de l'espèce humaine[28].

Cette variabilité à des conséquences importantes dans le domaine de la pharmacologie.
L'existence de polymorphismes génétiques affectant l'efficacité et/ou la toxicité des agents anti-cancéreux est établie. A ce jour, il s'agit de polymorphismes touchant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, comme la dihydropyrimidine déshydrogénase pour le 5 fluorouracile[29,30], la thiopurine méthyltransférase pour la mercaptopurine[31], la glucuronosyl transférase pour l'irinotecan[32],

Une autre classe de gènes dont les polymorphismes pourraient être impliqués dans la réponse et/ou la toxicité aux agents anti-cancéreux sont ceux codant pour des transporteurs membranaires responsables de l'influx ou l'efflux de ces agents, en particulier les transporteurs ABC que nous développerons ultérieurement[33,34].

1.1.2. Pharmacogénomique des anticancéreux

La pharmacogénomique est donc l'étude de l'influence de la variabilité du génome sur la variabilité de la réponse à un traitement médicamenteux. La fréquence de ces différents génotypes varie en fonction de l'origine ethnique ou géographique. Les répercussions cliniques de ces variations du transport, du métabolisme ou de la cible thérapeutique d'un médicament liées au génome sont particulièrement importantes lorsque l'index thérapeutique du médicament est faible ou lorsque le médicament pour être efficace doit être activé par une réaction enzymatique[13-15]. Les enjeux tant liés à l'épidémiologie des cancers que leur diversité mais également l'importance vitale de l'optimisation des prises en charge ont fait de cette nouvelle branche de la pharmacologie clinique un nouvel atout de la prise en charge personnalisée s'intéressant non seulement à la tumeur mais aussi à l'hôte qui est finalement l'échiquier où se rencontrent la maladie et ces traitements[35].

Utilisant cette approche, Il a ainsi été mis en évidence que l'existence de mutations germinales et de mutations somatiques peuvent influencer la pharmacologie des anticancéreux et ceci tant concernant leur efficacité que leur toxicité.

- Les mutations germinales expliquant des différences de toxicité ou d'activité portent le plus souvent sur des enzymes du métabolisme du médicament
- Les mutations somatiques expliquant essentiellement des différences d'activité portent le plus souvent sur les cibles thérapeutiques des agents anticancéreux

Quelques exemples viennent illustrer l'importance de ces mutations et donc de la pharmacogénétique appliquée à la prise en charge personnalisée des cancers

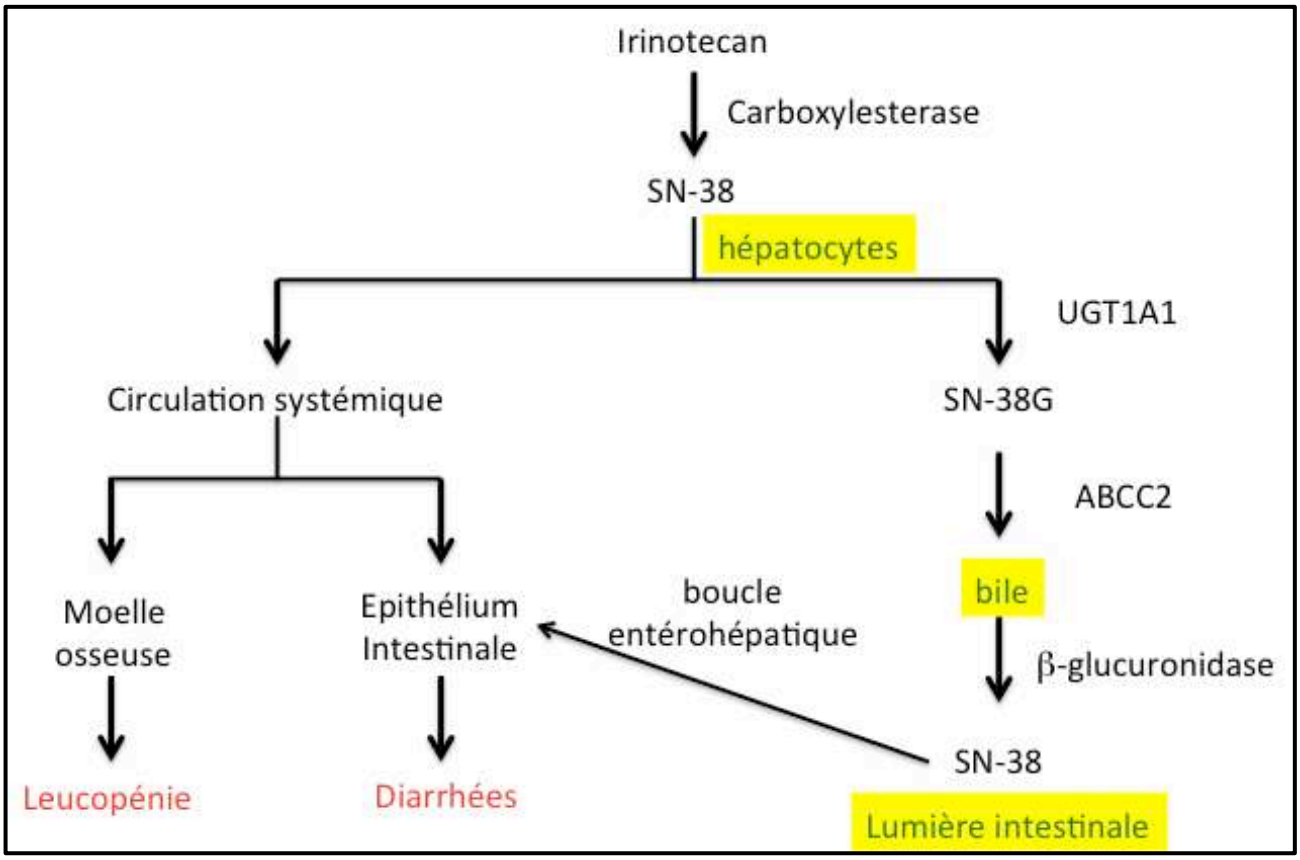
1.1.2.1. Mutations germinales et réponses aux traitement anticancéreux

Irinotecan et UGT1A

L'irinotecan est une des pro-drogues de la camptothecine qui est convertie par une carboxylesterase endogène hépatique en SN-38 lui-même inhibiteur de la topoisomérase I. Le SN-38 est inactivé par glucurono-conjugaison via l'UDP-Glycosyltransferase 1 polypeptide A1 (UGT1A1) en SN-38G. Le SN38-G est excrété dans la bile transporté par le transporteur membranaire ABCC2 et reconverti dans l'intestin après action d'une β-

glucuronidase en SN-38. Ce SN-38 intestinal est réabsorbé et retourne au niveau hépatique formant ainsi un cycle entérohépatique. Le variant *UGT1A1*28* (responsable de la maladie de Gilbert) et à moindre niveau *UGT1A1*6* et *ABCC2*2* ont été les plus étudiés et sont associés à un risque accrue de toxicité de l'irinotécan (figure 1)[36,37]. Les applications cliniques sont évidentes permettant une approche personnalisée du traitement non seulement en ce qui concerne l'efficacité mais également la toxicité pour les patients traités par irinotecan[38].

Figure 1 : Métabolisme de l'irinotecan (D'après[39])



Méthotrexate et SLCO1B1

Le méthotrexate est un analogue de l'acide folique inhibant la dihydrofolate réductase, utilisé dans le traitement de nombreux cancers mais plus particulièrement dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. Cherchant à comprendre les différences de toxicité entre patients, les études de pharmacocinétique et de pharmacodynamique ont mis en évidence une variabilité inter-individuelle importante mais c'est l'étude du

polymorphisme du transporteur anionique Solute Carrier Organic anion transporter family member 1B1 (SLCO1B1) qui a été récemment identifié comme un déterminant majeur de la clairance du méthotrexate et de son élimination hépatique et sa toxicité digestive[40].

Mercaptopurine et TPMT

La mercaptopurine est un analogue des purines utilisé également dans le traitement d'entretien des leucémies aigues lymphoblastiques de l'enfant. Elle est convertie en 6-thioguanine nucleotides (TGNs) et incorporée dans l'ADN. La mercaptopurine est inactivée au niveau du tissu lymphoïde préférentiellement par la thiopurine S-methyltransferase (TPMT). L'existence de polymorphismes non synonymes fréquents au sein de la population générale explique des risque de toxicité majeure[41] et la recommandation actuelle par la FDA quand au génotypage de *TPMT* avant utilisation de la mercaptopurine. Par ailleurs, il a été montré dans le cadre d'un essai thérapeutique que l'adaptation posologique chez des enfants porteurs du variant non fonctionnel de *TPMT* conduisait à une efficacité et une toxicité identique que celle de l'utilisation aux doses standards chez des patients ayant un variant fonctionnel[42].

Tamoxifène et CYP2D6

Le tamoxifène est un inhibiteur compétitif des estrogènes et doit pour être actif être transformé en endoxifène par les cytochromes P450 2D6 (CYP2D6) et P450 3A4/5 (CYP3A4/5). Si de premières études avaient conclu un lien entre certains variants de *CYP2D6* et l'efficacité ou la toxicité du tamoxifène [43,44], des études plus récentes n'ont pas retrouvé ce lien suggérant que d'autres cytochromes puissent être impliqués dans le métabolisme du tamoxifène[45]. Toutefois l'importance du CYP2D6 dans le métabolisme des médicaments explique les nombreuses études ayant porté sur ce cytochrome et permettant au sein de la population générale de classer les individus en 4 groupes définit en fonction de l'activité métabolique du CYP2D6. Le niveau de cette activité est liée soit à des polymorphismes différents soit à un nombre de copies du gène différent soit à l'appartenance à des origines ethniques différentes. On distingue ainsi les métaboliseurs « pauvres », « intermédiaires », « extensifs » ou « ultra-rapides »[46].

Nous avons vu que tous ces exemples portants sur des mutations germinales pouvant modifier l'index thérapeutique des anticancéreux portent sur des protéines de transport ou des enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament pouvant amener à des modifications pharmacocinétiques importantes du médicament.
Par ailleurs, les nouvelles approches thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux et dont le mécanisme d'action passe par une cytotoxicité anticorps dépendante à médiation cellulaire (ADCC) n'échappent pas à l'importance probable du polymorphisme de le cible effectrice de cette action des anticorps que sont les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines[47].

1.1.2.2. Mutations somatiques et réponses aux traitements anticancéreux

5FU et DPD

La dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) est responsable à elle seule de près de 85% du catabolisme du 5-fluorouracile (5FU). Plusieurs études ont démontré le lien qui existe entre déficit en DPD et toxicité aigue du 5FU[29]. L'étude du polymorphisme du gène DPYD a permis de mettre en évidence plus de 30 SNPs sans toutefois retrouver de lien franc entre un SNP, une inactivation de la DPD et une toxicité clinique liée au défaut d'élimination du 5FU[48] raison pour laquelle à ce jour la mesure de l'activité de la DPD est préférée à celle de l'étude du polymorphisme de son gène lorsque l'on souhaite diagnostiquer ce déficit et modifier la stratégie de prise en charge de certains cancers sans utiliser le 5FU[49].

Imatinib et BCR/ABL

L'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant la translocation la plus fréquente dans la leucémie myéloïde chronique : BCR/ABL. L'étude des mutations de BCR/ABL a permis de mettre en évidence des clones cellulaires résistants à l'imatinib[50] et de définir ainsi des stratégies de prise en charge utilisant soit des inhibiteurs de seconde génération permettant de contourner certaines résistances comme le dasatinib ou le nilotinib, soit une augmentation de posologie de l'imatinib[51]

KRAS et EGFR

Le ciblage d'EGFR est une approche thérapeutique importante dans de nombreux cancers dont les cancers bronchiques et les cancers colorectaux. Différents traitements cibles le récepteur lui-même, que ce soit des anticorps monoclonaux comme le cetuximab ou le panitumumab ou des inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'erlotinib ou le gefitinib. Des mutations somatiques ou des délétions restreintes du gène codant pour le récepteur sont assez fréquentes et associées à la résistance ou la sensibilité aux traitements par TKI via la modification de l'interaction stérique entre la molécule, l'ATP et le récepteur[52,53]. Par ailleurs, KRAS est l'une des molécules de signalisation impliquée dans la transduction du signal EGFR. Les mutations au sein des codons 12 et 13 de *KRAS* sont associées à une activation de cette voie indépendamment de la stimulation ou l'inhibition du récepteur EGFR et expliquent l'inefficacité des traitements par anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal. Les recommandations internationales retiennent donc l'utilisation de ces traitements dans le cancer colorectal uniquement chez les patients n'ayant pas de mutation des codons 12 ou 13[54].

Nous avons vu que ces exemples portants sur des mutations somatiques pouvant modifier l'index thérapeutique des anticancéreux portent essentiellement sur des protéines cibles des traitements ou impliquées dans la voie de signalisation qui en découle pouvant amener à des modifications d'efficacité importantes du médicament. Pourtant, l'absence d'efficacité croisée des inhibitions d'un récepteur (comme l'EGFR) par des molécules aux mécanismes d'action différents (TKI ou anticorps monoclonaux) dans des modèles différents de cancers (bronchique ou colorectal) demeure à ce jour sans explication claire.

1.2. Pharmacologie des taxanes.

Les taxanes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées basiques (donc pouvant être classés dans la famille des alcaloïdes). La molécule originelle -paclitaxel- fut isolée des extraits d'if du pacifique *(Taxus Brevifolia)* en 1964 par Wani et Wall[55]. Bien que la structure de la molécule ait été déterminée rapidement, elle ne fut pas expérimentée immédiatement en clinique du fait de disponibilités limitées liées à son

extraction de l'écorce d'un arbre mettant 200 ans pour atteindre sa maturité et nécessitant donc la possibilité d'une synthèse chimique pour tout développement clinique. Ce n'est de ce fait qu'en 1979, que l'équipe de Susan Horwitz en explorant le mécanisme d'action de ce nouvel agent découvrit son action antimitotique via son interaction avec la formation de microtubules[56]. La même équipe démontra dans un second temps que l'exposition de lignées cellulaires tumorales à de plus faibles concentrations avait un effet anti-apoptotique[57]. Parallèlement aux premières expérimentations précliniques et cliniques, son utilisation pouvant entrainer une très grande consommation d'if, des recherches portèrent sur les possibilités de synthétiser ou identifier de nouveaux agents ayant un mécanisme d'action similaire. En France, des travaux dirigés par l'équipe de Pierre Potier conduisent à deux découvertes scientifiques majeures. La première est la découverte d'une nouvelle molécule qui s'est révélé active lors des tests in vitro et in vivo issue de l'if européen *(taxus baccata)* et permettant d'inhiber la dépolymérisation des microtubules. Il s'agit du docétaxel. La seconde découverte est la mise au point d'un procédé d'hémi-synthèse qui permet d'obtenir des taxoïdes en grande quantité à partir d'une source biologique renouvelable : l'aiguille d'if, qui contient de la 10-désacétylbaccatine III (10 DAB). Depuis, la production industrielle du paclitaxel et docétaxel sont possible[58].

Trente en ans après la découverte du paclitaxel, en 1992, la *Food and Drug Administration* (FDA) délivre une autorisation de mise sur le marché pour son utilisation dans le traitement du cancer de l'ovaire et en 1995 pour l'utilisation du docétaxel dans le cancer du sein.

A ce jour trois taxanes sont disponibles en utilisation clinique. Il s'agit du paclitaxel, du docétaxel et plus récemment du cabazitaxel. Parmi eux, seuls le paclitaxel et le docétaxel sont utilisés dans le traitement du cancer du sein et sont devenus une arme incontournable dans la prise en charge de ces cancers[59]. Plusieurs recommandations nationales et internationales préconisent leur utilisation en situation adjuvante, néoadjuvante et métastatique[60].

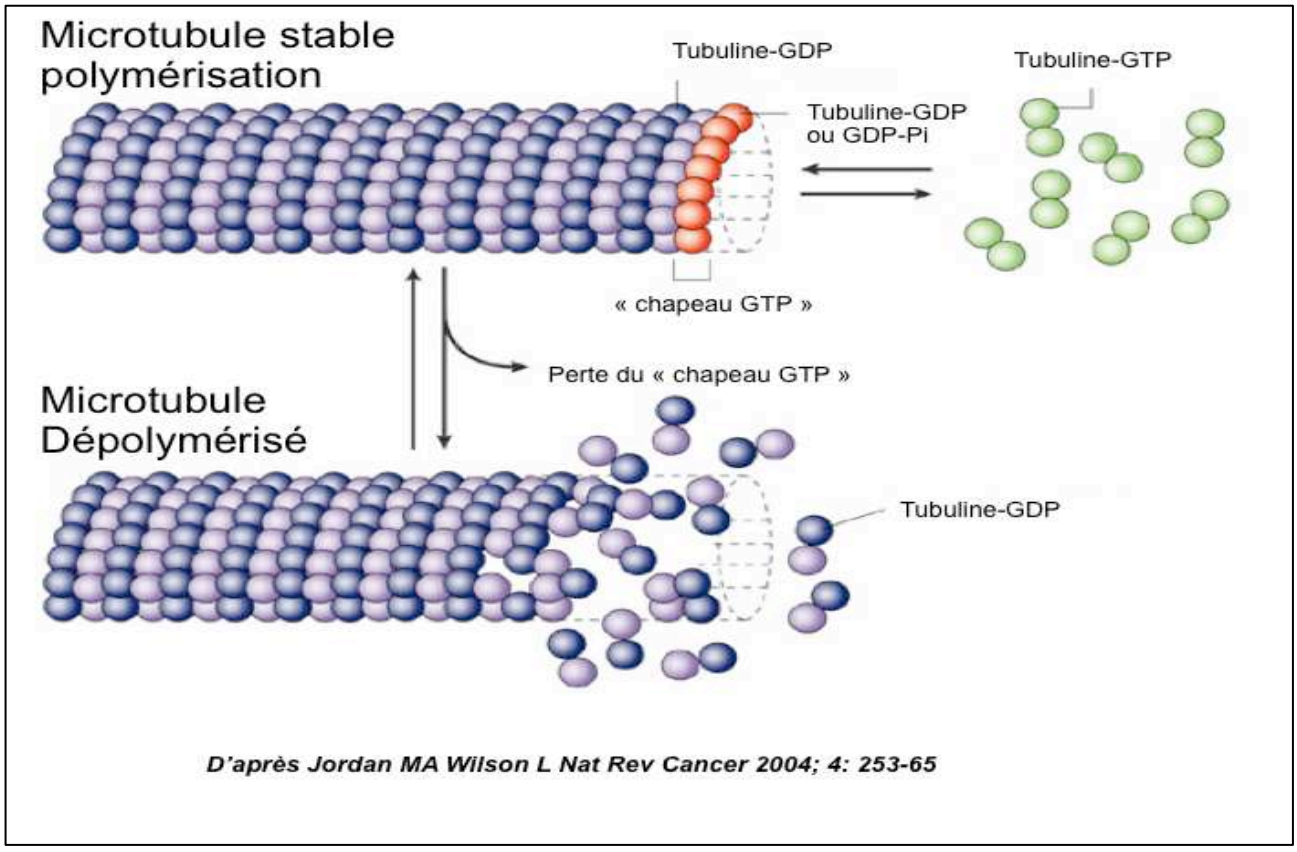
1.2.1. Mécanismes d'action.

Le principal mécanisme d'action des taxanes est l'inhibition de la fonction des microtubules, fibres constitutives du cytosquelette, impliqués également dans la formation de la plaque équatoriale et le déplacement polaire des chromosomes pendant la mitose. De ce fait ils doivent être considérés comme des poisons du fuseau (ou antimitotiques vrais), au même titre que les alcaloïdes de la pervenche[61].

La tubuline est la protéine structurelle des microtubules, Elle a une masse moléculaire d'environ 100 kDa et est composée de 2 sous-unités α et β. Ces deux sous-unités de tubulines sont très proches, ne différant que par quelques acides aminés (5-10% de la chaine), ont des masses moléculaires d'environ 50 kDa chacune et se lient au GTP. Toutefois c'est l'état de la sous-unité β qui définit l'état "GTP" ou "GDP" de la tubuline. C'est elle qui est à l'origine de la dynamique des microtubules. Suivant sa concentration dans la cellule, elle va en diriger la polymérisation ou la dépolymérisation. Une concentration élevée de tubuline-GTP amène à la polymérisation des dimères α-ß formant les protofilaments constitutifs du microtubule. Une couronne de tubuline-GTP dénommée le « chapeau » sert à la polymérisation. En revanche, une concentration basse de tubuline-GTP conduit à la dépolymérisation des protofilaments et des microtubules.

Cette instabilité dynamique des microtubules correspond donc à une alternance de phases d'allongement lentes (GTP dépendante) et de raccourcissement rapides (GDP dépendante) à leurs extrémités indispensables notamment au bon déroulement de la mitose[62] (figure 2).

Figure 2. Représentation de la polymérisation et dépolymérisation de la tubuline en fonction de l'existence ou de la perte du « chapeau GTP »

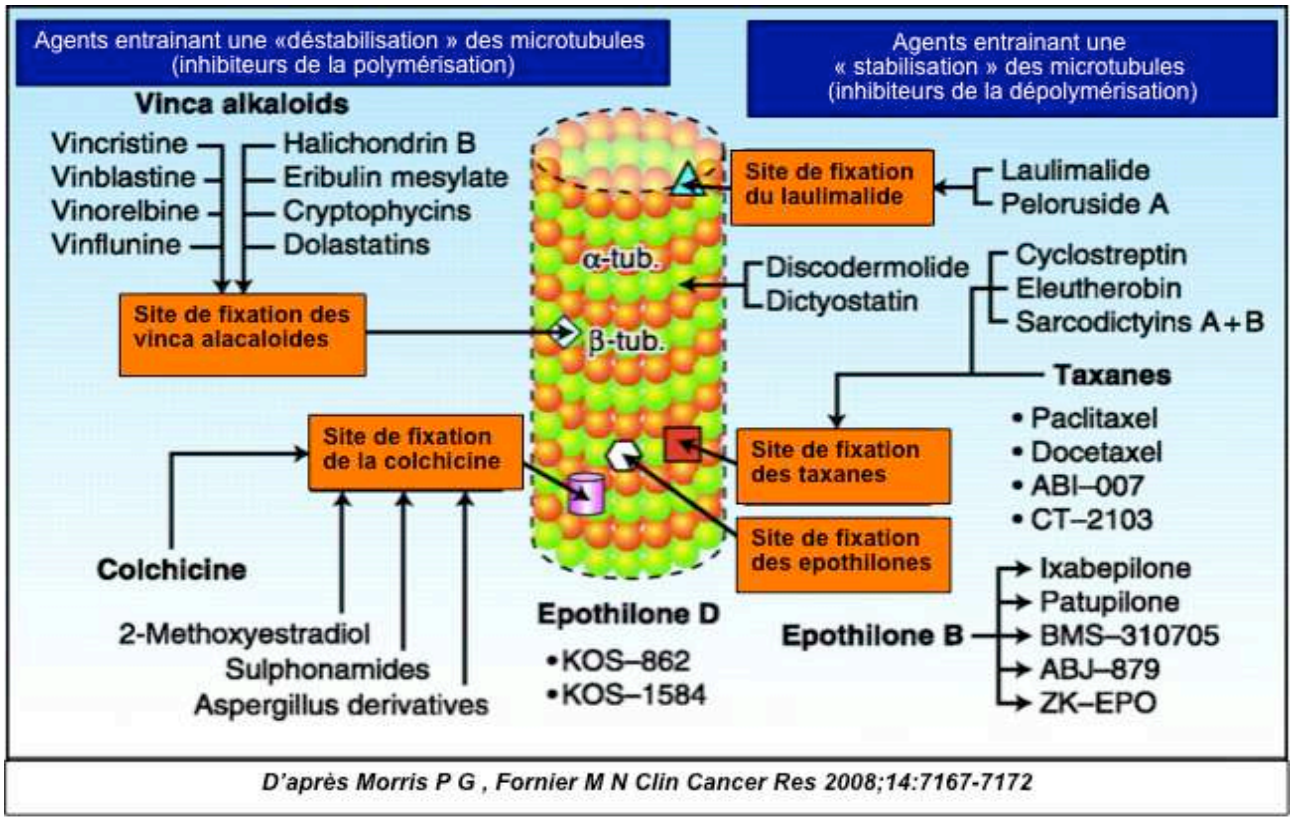


D'après Jordan MA Wilson L Nat Rev Cancer 2004; 4: 253-65

La tubuline possède 3 sites de liaison, qui sont les cibles de médicaments anticancéreux (figure 3) :

- le site de fixation des colchïnoides (colchicine) correspondant à la tubuline soluble complexe entrainant une inhibition de la polymérisation des microtubules,
- le site de fixation des vinca alcaloïdes situé à l'extrémité (haute affinité) ou le long des microtubules (faible affinité) entrainant également une inhibition de la polymérisation et à fortes concentrations la formation de para-cristaux,
- le site de fixation des taxanes situé au niveau de la sous-unité β de la tubuline et induisant une polymérisation tout en stabilisant les microtubules sous cette forme et empêchant donc la dépolymérisation.

Figure 3. Agents « stabilisants » et « déstabilisants » du microtubule et sites de fixation



D'après Morris P G , Fornier M N Clin Cancer Res 2008;14:7167-7172

Tous ces agents entrainent donc à doses modérées des effets identiques qui sont une suppression de l'instabilité dynamique des microtubules, des anomalies du fuseau mitotique entrainant un blocage en mitose et une mort cellulaire par apoptose[61]. L'effet anti-apoptotique du docétaxel pourrait être en partie la résultante de l'inhibition de l'hyper expression de Bcl2 (protéine pro-apoptotique)[63].

Le docétaxel et le paclitaxel ont toutefois une pharmacologie moléculaire, différente pouvant potentiellement expliquer des profils d'activité et de toxicité différents (tableau 1)[64].

La première différence est liée aux affinités différentes de ces deux agents pour la sous-unité β de la tubuline qui est plus importante pour le docétaxel avec des taux moindres de concentration entrainant une polymérisation maximale. Par ailleurs, le docétaxel entraine une apoptose en phase G2/M par blocage des cellules en phase S, alors que la résistance cellulaire à l'exposition au paclitaxel est la plus forte en phase S. Mais le mécanisme de résistance le plus important aux poisons du fuseau est lié au phénotype MDR (Multi Drug Resistance) médié par ABCB1 (également dénommée P-gp ou MDR1) que nous reverrons ultérieurement. Les taxanes sont des substrats de la P-gp, mais l'efflux de docétaxel semble moins important que celui du paclitaxel par rapport à la disponibilité dans la cellule tumorale.

Enfin, il a été montré que le docétaxel pourrait avoir des propriétés immunomodulatrices entrainant un afflux de lymphocytes T « helper » et « NK » sur des modèles précliniques d'association à la radiothérapie[65]. Par ailleurs, il a été montré que les taxanes en administration hebdomadaire à faibles doses pouvaient avoir des propriétés antiangiogéniques[66].

Pour la suite, étant donné l'utilisation du docétaxel dans nos travaux, nous n'aborderons que la question de la pharmacocinétique et pharmacodynamique de ce médicament.

Tableau 1 : Différences d'activité pharmacologique entre le docétaxel et le paclitaxel. (d'après[64])

Propriétés	Docétaxel	Paclitaxel	Remarques
Niveau d'affinité pour la sous-unité β de la tubuline	1.9	1.0	Affinité supérieure expliquant probablement une action pro-apoptotique plus importante à concentrations équivalente
Concentration du médicament entrainant une polymérisation maximale des microtubules	0.2mM	0.4mM	
Ciblage des microtubules	organisation du centrosome	fuseau mitotique	Le docétaxel interagit avec l'organisation du centrosome en phase S à la différence du paclitaxel qui interagit essentiellement avec le fuseau mitotique
Spécificité d'action au niveau du cycle cellulaire	S, G2, M	G2, M	
Rapport entrée / sortie (P-gp) intra tumorale	1 pour 1/3	1 pour 1	

1.2.2. Pharmacocinétique.

Modalités d'administration :

Le docétaxel s'administre uniquement par voie intraveineuse puisque sa biodisponibilité par voie orale est quasi nulle et ceci est lié au fait que le médicament est un des substrats de la P-glycoprotéine (P-gp) [également dénommée MDR1 (Multi Drug Resistance 1) ou ABCB1 (ATP Binding Cassette B1)] présente au niveau intestinal mais également du cytochrome *P450* 3A (CYP3A). Des études in vivo sur des souris *knockout* pour CYP3A et/ou MDR1 concluent non seulement à une amélioration de la biodisponibilité du docétaxel administré par voie orale (12 fois plus en cas de souris *Cyp3a*$^{-/-}$ et 3 fois plus en cas de souris *Mdr1a/1b*$^{-/-}$) mais surtout un effet disproportionné de biodisponibilité en cas de combinaison de l'invalidation de ces deux gènes (70 fois plus en cas de souris *Cyp3aMdr1a/1b*$^{-/-}$) avec des toxicités létales[67].

Pharmacocinétique descriptive :

Absorption :

Le docétaxel est donc administré en clinique en perfusion intraveineuse d'une heure selon des doses allant de 20 mg/m^2/semaine jusqu'à 115mg/m^2/3 semaines d'après les données de la littérature[68-73]. Le docétaxel a un profil cinétique linéaire dépendant de la dose après 70mg/m^2. A la dose de 55 mg/m², le profil pharmacocinétique du docétaxel est bi-phasique. A la dose de 100mg/m², le profil est conforme au modèle pharmacocinétique à 3 compartiments, caractérisé par des demi-vies α, β et Ɣ de 4 minutes, de 36 minutes et de 11,1 heures respectivement[68]. La clairance corporelle totale s'établit à 21 L/h/m^2. Les résultats des études de pharmacocinétique des populations chez des patients recevant du docétaxel en situation thérapeutique étaient très proches de ceux qui avaient été obtenus lors des études de phase I[55,74].

Distribution :

La décroissance initialement rapide de la concentration du docétaxel est en rapport avec la distribution du médicament vers les compartiments périphériques et la décroissance terminale lente est liée à un efflux plus lent du docétaxel du compartiment périphérique. Le volume moyen de distribution à l'état d'équilibre s'établit à 113 L. Quatre vingt quinze pourcent du médicament se lie indépendamment de sa concentration plasmatique aux protéines plasmatiques (α1-acide glycoprotéine, albumine et lipoprotéines)[75]. Toutefois il est important de noter qu'en plus des protéines plasmatiques, la concentration de polysorbate 80 est le deuxième paramètre influençant le taux de docétaxel libre expliquant ainsi sa toxicité[76].

Métabolisme :

Le métabolisme du docétaxel est surtout hépatique lié à l'activité du Cytochrome P450 CYP3A amenant via une oxydation de l'ester tert-butyl à la transformation du docétaxel en 4 métabolites inactifs (M1-M4). L'activité de CYP3A influe le métabolisme et donc la pharmacocinétique du docétaxel[77]. Tout autre traitement interagissant avec le CYP3A modifie donc le métabolisme du docétaxel[75]. L'importance du CYP3A dans le métabolisme du docétaxel sera abordé par la suite.

Elimination :

L'étude pharmacocinétique sur 3 patients du docétaxel-C14 injecté en IV et en 1h à la dose de 100mg/m² a permis de conclure que l'excrétion est essentiellement fécale, 75% de la radioactivité éliminée contre 6% dans les urines sur une période de 6 jours. Environ 80% de la radioactivité dans les fèces est excrétée au cours des premières 48 heures avec de très petites quantités (moins de 8%) du médicament inchangé[75]. L'élimination est donc essentiellement liée à l'excrétion biliaire.

Toxicités :

Les toxicités limitantes (neutropénie dose-dépendante limitante si > 110 mg/m²) et sévère (toxicité sur les muqueuses en cas de perfusion longue) à l'issue des essais de phase I ont permis de conclure à une administration maximale du docétaxel à la posologie de 100 mg/m²/3 semaines en 1 heure ou 33 mg/m²/semaine en 1 heure[75].

Les autres toxicités non limitantes retrouvées on été l'anémie, la thrombopénie, une alopécie, des réactions d'hypersensibilité, mais surtout un effet indésirable moins courant avec les chimiothérapies qui est le risque de rétention hydrique nécessitant une prémédication par corticothérapie encadrant la perfusion[75].

Pharmacocinétique analytique :

Différents paramètres ont été explorés afin d'identifier ceux qui pouvaient influencer la pharmacocinétique du docétaxel. On admet aujourd'hui qu'il existe une variation inter-individuelle en moyenne d'environ 10%[78].

L'âge des patients semble influer sur la pharmacocinétique du docétaxel de façon inégale[79] [80]. En ce qui concerne le sexe, il a été régulièrement retrouvé dans les études portant sur des populations mixtes ou comparatives que la clairance du docétaxel chez les femmes était réduite de 10 à 35% par rapport à celle des hommes [81-83].Lorsque l'on compare les résultats des essais de phase I en Occident et l'essai de phase I au Japon, on constate que la dose maximale tolérée recommandée pour les études ultérieures au Japon était de 90 mg/m^2 contre 100 mg/m^2 en Europe et aux Etats Unis, suggérant l'absence de différence significative dans l'élimination du docétaxel dans les deux populations[55,69-71,73,84]. Par ailleurs, une étude comparant la pharmacocinétique du docétaxel chez des patients afro-américains et caucasiens n'a pas retrouvé de différence

entre ces deux populations[85]. Ces éléments ne permettent donc pas de retenir l'influence de l'ethnie sur le métabolisme du docétaxel.

En ce qui concerne les paramètres influençant la distribution du docétaxel et notamment sa liaison aux protéines plasmatiques, on retiendra l'α1-acide glycoprotéine (plus connue en clinique sous le nom d'orosomucoïde) dont la concentration plasmatique influe sur la pharmacocinétique du docétaxel[86,87]. C'est une glycoprotéine de poids moléculaire de 44000 kDa, faisant partie des protéines de phase aiguë. Elle est codée par deux gènes polymorphes et synthétisée principalement dans les hépatocytes. Son taux plasmatique est faible 0.6-1.2 g/l1. Ses concentrations plasmatiques sont modifiées par la grossesse, certains médicaments (antibiotiques, anti-inflammatoires, bêta-bloquants, œstroprogestatifs) et certaines maladies, notamment le VIH1. Sa seule fonction connue est de servir de transporteur de composés lipophiles basiques ou neutres. En médecine, elle est connue comme le principal transporteur des médicaments basiques, des stéroïdes et des inhibiteurs de protéases1 et 2. Une équipe japonaise a récemment étudié l'influence de la chirurgie chez les patientes atteintes de cancer du sein sur la concentration d'orosomucoïde et ses variantes. Les concentrations postopératoires de la protéine chez les patients avec un cancer du sein précoce sont deux fois plus élevées après qu'avant la chirurgie. Les concentrations relatives des variantes dénommés F1 et S ont été considérablement augmentées, tandis que celui de la variante A n'a pas été sensiblement modifiée[88]. Dans ces conditions il n'est pas exclu que la pharmacocinétique du docétaxel entre les situations pré et postopératoires puisse être différente.

Nous avons également vu que le docétaxel a un profil de cinétique linéaire mais que la dose administrée influe sur la cinétique du docétaxel et le modèle compartimental de distribution. Aux modalités d'utilisation les plus fréquentes en clinique entre 70 et 115 mg/m2 toutes les 3 semaines la durée d'administration ne semble pourtant pas influencer la pharmacocinétique[75].

Un point essentiel en pharmaco-oncologie demeure l'influence des traitements administrés de façon concomitante ou séquentielle pouvant modifier la pharmacocinétique de l'agent étudié. Nous rappelons ici essentiellement les travaux ayant porté sur l'analyse de l'interaction avec les anthracyclines et le cyclophosphamide classiquement utilisés dans

les schémas de chimiothérapie néoadjuvante, le trastuzumab pour les populations HER2 positives ou la prémédication cortisonique systématiquement associée.
Plusieurs études ont été menées ne retrouvant pas d'interaction pharmacologique entre l'administration d'anthracyclines, de cyclophosphamide et de docétaxel de façon concomitante[82,89,90]. Par ailleurs, on note une différence importante avec le paclitaxel puisque l'ordre d'administration anthracyclines-taxanes n'est pas important pour le docétaxel alors qu'il l'est pour le paclitaxel (son administration après l'anthracycline modifie la pharmacocinétique de celle-ci)[91].

Les données pharmacologiques concernant le trastuzumab concluent à des caractéristiques comparables à celle des IgG endogènes sans données d'interactions pharmacologiques avec les taxanes[92]. Les données cliniques des essais thérapeutiques ayant exploré l'association du docétaxel avec le trastuzumab n'ont pas non plus retrouvé d'interactions pharmacologiques négatives mais au contraire une synergie[93].

L'utilisation systématique d'une corticothérapie comme prémédication préventive du syndrome de rétention et son interaction potentielle avec la pharmacocinétique du docétaxel a été également explorée en clinique[94,95]. Aucun effet de la dexamethasone ou de la prednisone sur les paramètres pharmacocinétiques du docétaxel n'a été observé. Toutefois, la dexamethasone étant un substrat du CYP3A4, il a été montré que la clairance du docétaxel était corrélée à la pharmacocinétique de la dexamethasone étudiée au préalable ainsi que le taux d'orosomucoïde mais ceci uniquement chez la femme[77,96].

Chez un petit nombre de patients dont les données biologiques évoquaient une insuffisance hépatique légère ou modérée (taux de l'alanine aminotransférase ou de l'aspartate aminotransférase égal ou supérieur à 1,5 fois la limite supérieure de la normale associé à un taux de phosphatases alcalines égal ou supérieur à 2,5 fois la limite supérieure de la normale), il a été observé une diminution moyenne de 27 % de la clairance totale expliquant une toxicité accrue[70,74,97]. Ces éléments sont à rapprocher de l'importance du métabolisme hépatique du docétaxel via l'activité du CYP3A que nous avons évoqué ci-dessus, avec comme conséquence de pouvoir potentiellement adapter la dose de docétaxel chez les patients ayant une perturbation du bilan hépatique en fonction de l'évaluation de l'activité du CYP3A via le test respiratoire à l'érythromycine[98].

Ainsi la clairance du docétaxel peut être estimée par la formule intégrant les paramètres principaux l'influant : CL=BSA(22.1-3.55AAG-0.095age+0.2245ALB)x(1-0.334HEP12) [79] pour BSA=Surface corporelle(en m^2) ; âge (en années) ; AAG=α1-acide glycoprotéine (en g/L) ; ALB=albumine(g/L) ; HEP12= score tenant compte du taux de bilirubine et de transaminases.

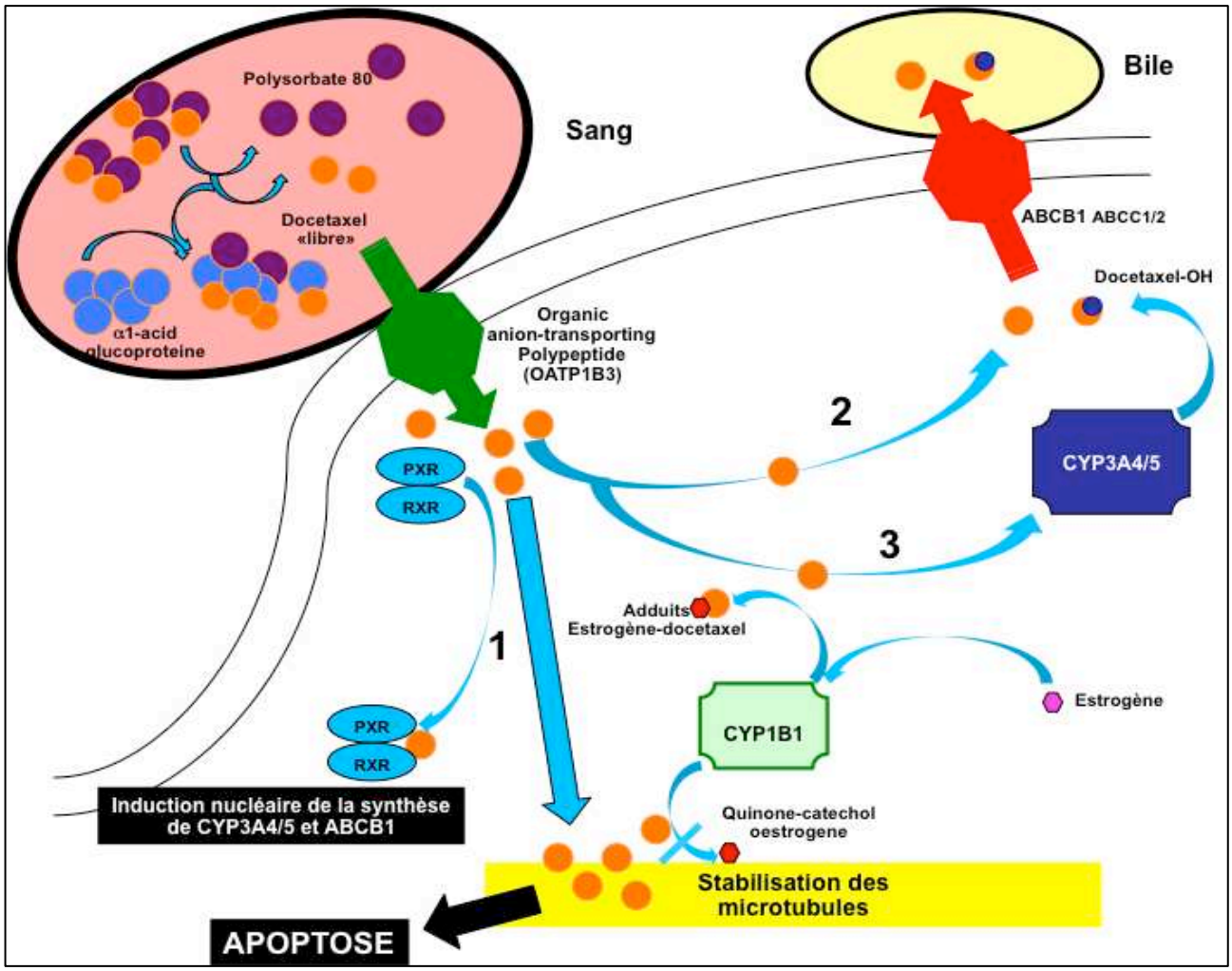
1.2.3. Métabolisme et Pharmacodynamie.

Le docétaxel est donc le substrat de plusieurs protéines expliquant les effets pharmacodynamiques de ces protéines ainsi que d'autres molécules interagissant avec elles. Les principales « voies métaboliques » du docétaxel au niveau cellulaire (hépatocyte pour son métabolisme mais également cellules tumorales) sont résumées sur la figure 4.

L'entrée du docétaxel au niveau cellulaire s'effectue via un transporteur de la famille OATP, puis 3 voies sont importantes expliquant son métabolisme et la pharmacodynamique du docétaxel.

1. Passage cytoplasmique et interaction avec la tubuline au niveau de son site de fixation entrainant une apoptose. Mais il existe également une interaction nucléaire avec les récepteurs RXR et PXR. RXR ou Retinoid X Receptor est une protéine de la famille des récepteurs nucléaires ligand-dépendants activée par son association avec le récepteur de l'acide rétinoïque (ou vitamine A). Pregnane X Receptor (ou PXR) est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires (famille des récepteurs orphelins) entrainant une transcription des gènes impliqués dans les phénomènes de détoxification cellulaire, dont notamment celui du CYP3A et ABCB1[99,100].
2. Une élimination du docétaxel directement via ABCB1.
3. Une succession d'hydroxylations du docétaxel via CYP3A4/5 entrainant une inactivation et une élimination des formes inactives via ABCB1. Le cytochrome CYP1B1 peut en générant une oxygénation de l'œstrogène induire une inhibition de l'action du docétaxel soit via l'interaction directe estrogène-docétaxel (formation d'adduits) soit en favorisant la fixation de cet œstrogène transformé au niveau de la tubuline empêchant ainsi la fixation du docétaxel sur son site[101,102].

Figure 4. Métabolisme du docétaxel et interactions protéiques expliquant les différences pharmacodynamiques éventuelles (1,2,3 mentionnés ci-dessus).



Importance des cytochromes dans la pharmacodynamie du docétaxel

Plusieurs travaux ont exploré l'importance du CYP3A sur la pharmacocinétique du docétaxel. L'activité du CYP3A est modifiée par de nombreux facteurs que sont le polymorphisme génétique, les facteurs physiologiques comme l'âge ou le sexe, les facteurs environnementaux (comme le tabagisme) ou des interactions pharmacologiques (autres médicaments substrats du CYP3A) ou alimentaires. Ces facteurs peuvent provoquer des différences inter-individuelles dans la pharmacocinétique du docétaxel conduisant à des variations de son efficacité et/ou de sa toxicité.

CYP3A4 et CYP3A5 sont les deux enzymes les plus impliquées dans la biotransformation du docétaxel et plusieurs équipes ont essayé de corréler la pharmacocinétique du docétaxel à certains polymorphismes CYP3A4 *1B et CYP3A5 *3C avec cependant des résultats contradictoires[85,99,103-108109]. Des données plus récentes suggèrent toutefois l'importance de CYP3A si l'on considère l'haplotype CYP3A4/5. En effet, Baker et al ont

constaté que les porteurs d'un haplotype composé de CYP3A4 *1B et CYP3A5 *1A (qui a été dénommé CYP3A4/5 *2) avaient une clairance du docétaxel majorée de 64% ainsi que du midazolam de 46% autre substrat de CYP3A4/5[81]. Une seconde étude retrouve des résultats comparables[110], mais il est important de noter que ces deux études portent au total sur un nombre très limité de patients et par ailleurs sur une population exclusivement caucasienne. Toutefois, les premières études ne comportant pas l'évaluation de l'impact pharmacocinétique de l'haplotype CYP3A4/5 *2 il est difficile à ce jour de conclure.

Certaines approches pharmacologiques (l'utilisation notamment de ketoconazole à fortes doses) ont été utilisées afin d'inhiber l'activité du CYP3A en espérant ainsi réduire fortement la variabilité de la clairance du docétaxel[111,112]. Les résultats n'ont pas permis d'établir un modèle permettant la réduction de cette variabilité traduisant l'existence d'un grand nombre de mécanismes contribuant à cette variabilité pharmacocinétique inter-individuelle du docétaxel. Si la pharmacocinétique du docétaxel est fortement liées à l'activité du CYP3A, son simple contrôle ne permet pas d'uniformiser les profils de pharmacocinétique témoignant de l'importance d'autres voies métaboliques ou d'élimination du médicament.

Le CYP1B1 apparaît également comme de plus en plus important dans la compréhension de l'efficacité et de l'étude pharmacodynamique du docétaxel. Si une publication princeps suggérait que le docétaxel était un substrat de CYP1B1[113], des études ultérieures plus convaincantes ont permis d'infirmer cette hypothèse[114]. Il n'en demeure pas moins que CYP1B1 semble jouer un rôle important dans le métabolisme du docétaxel et ceci a d'ailleurs été étudié plus particulièrement chez les patients traités dans le cadre de cancers prostatiques[101,115]. Il semble clair que le polymorphisme CYP1B1*3 soit associé à une meilleure efficacité du docétaxel dans le cancer de la prostate[101,116,117] mais avec les réserves de ce modèle et l'importance également du CYP1B1 dans la voie métabolique des estrogènes qui interagissent avec le docétaxel comme nous l'avons vu plus haut.

1.3. ABCB1/MDR1.

Si la cellule représente l'entité organisée complexe minimale d'une forme de vie définie par sa capacité de vivre, de mourir et de se reproduire, cette cellule est délimitée par une structure qui définit ce qui en fait partie par rapport à ce qui l'entoure : la membrane[118]. Cette membrane n'est pas une simple bicouche lipidique mais un dispositif biologique complexe permettant le passage de multiples éléments sous diverses formes que ce soit ionique, glucidique ou protéique. Le passage de nombre de ces éléments nécessite l'utilisation de transporteurs dont parmi eux certains permettant le transport de substances s'opposant à un gradient naturel. L'existence même de ces transporteurs remonte très probablement du point de vue phylogénique aux premières formes de vie organisée, précurseurs des trois familles actuelles que sont les bactéries, les archées et les organismes eucaryotes dont nous ne sommes que l'une des ultimes branche de division[119].

Ces différents transporteurs transmembranaires sont classés en fonction de leur mécanisme d'action en différentes sous-familles (tableau 2).

Tableau 2. Classification des transporteurs transmembranaires

Canaux ➔➔➔➔	- transporteurs passifs - assurent un transport passif de molécules à travers la membrane suivant les lois de la diffusion en étant plus ou moins sélectives. - peuvent se fermer et s'ouvrir en fonction de différents stimuli - jouent un rôle important dans la définition du potentiel de membrane et la sensibilité de certaines cellules à certains signaux extérieurs.
Pompes ➔➔➔➔	- transporteurs actifs - se caractérisent par le couplage du transport à une réaction enzymatique exergonique, comme l'hydrolyse de l'ATP. - assurent un mouvement unidirectionnel possible contre le gradient électrochimique. - jouent un rôle très important dans la création et le maintien du gradient électrochimique membranaire (pompe Na+/K+) ou le maintien de la concentration cytosolique de calcium
Co-transporteurs ➔➔➔➔	- transport couplé d'un canal ionique à une pompe membranaire utilisant l'énergie fournie par un ion ou une autre molécule qui suit son gradient électrochimique pour activer un transporteur sans utiliser d'hydrolyse de l'ATP. L'énergie vient toutefois du gradient électrochimique, entretenu entre autres par la pompe Na+/K+, et l'on peut considérer que c'est bien l'ATP qui a fourni l'énergie, de manière indirecte, d'où le terme de transport primaire pour désigner les pompes ATPasiques et de transport secondaire pour les transports couplés. - selon le sens de déplacement respectif des deux molécules on parle de symport (l'ion et la molécule transportée traversent la membrane dans le même sens) ou d'antiport (les deux espèces chimiques se déplacent en sens inverse). - très utilisés par la cellule pour récupérer les molécules nécessaires à son métabolisme dans le milieu extérieur.

1.3.1. Transporteurs ABC : homologie et importance en cancérologie

Parmi les transporteurs membranaires, les transporteurs ABC ou transporteurs à « ATP-Binding- Cassette » forment la plus vaste famille de protéines transmembranaires. Ils agissent comme des pompes dont la fonction est le transport actif unidirectionnel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique de diverses substances en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP[120].

Cette famille est subdivisée en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) regroupant divers transporteurs classés selon leurs homologies structurelles et de séquences. Certaines de ces protéines ont été reliées à des pathologies génétiques assez fréquentes, telles que la mucoviscidose liée à des mutations du gène *ABCC7* codant pour la protéine CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ou le syndrome de Dubin-Johnson lié à des mutations du gène *ABCC2* codant pour la protéine MRP2[121,122].

La classification de ces protéines et leur nomenclature sont référencées sur le site http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm, et le tableau 3 résume les principales caractéristiques de ces protéines et leurs implications éventuelles en cancérologie.

Ces protéines ont des caractéristiques communes qui sont[123] :

- Leur fonction : le transport de molécules à travers la membrane cytoplasmique en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Elles permettent un transport unidirectionnel conduisant soit à l'entrée de molécules ou *importation* (essentiellement chez les procaryotes) soit la sortie de molécules ou *exportation* (procaryotes et eucaryotes). La grande majorité des membres de la famille des ABC est responsable du transport actif de divers composés au travers des membranes plasmiques des cellules, incluant des phospholipides, des ions, des peptides, des stéroïdes, des polysaccharides, des acides aminés, des anions organiques, des acides biliaires, des médicaments et d'autres xénobiotiques[122].

- Leur structure[123] : qu'ils aient une fonction d'importation ou d'exportation tous les transporteurs ABC partagent un degré élevé de similitude mécanistique. Ils ont 4 domaines au minimum (figure 5).

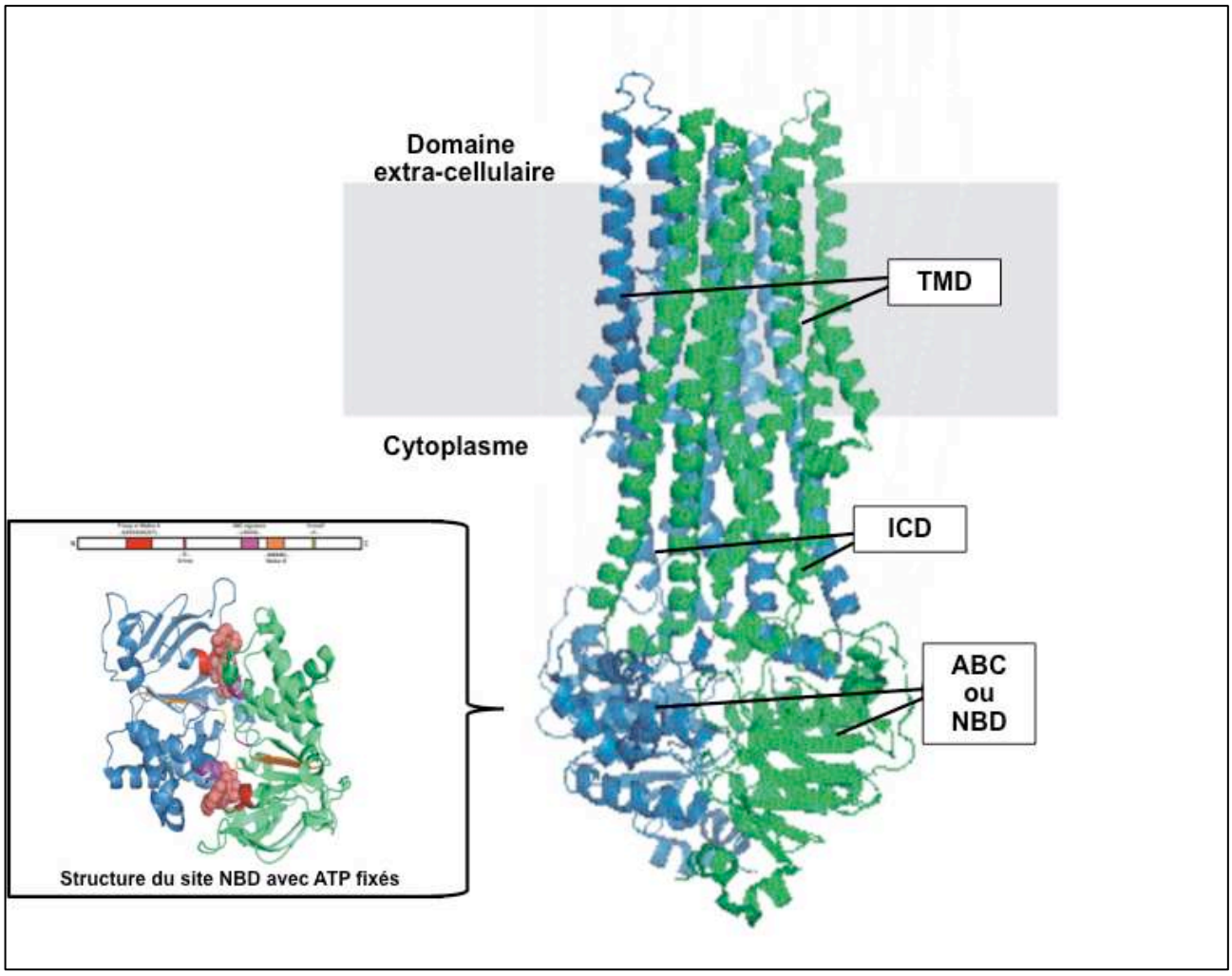
- Deux domaines transmembranaires dénommés également TMDs (Transmembrane Domains) ou MSDs (Membrane-Spanning Domains) voir IMDs (Integral Membrane Domains). Il est constitué d'hélices alpha très variables reflétant la diversité des substrats transportés.

- Deux domaines interagissant avec l'ATP dénommés ABCs (ATP Binding Cassettes) ou NBDs (Nucleotide Binding Domains) situés au niveau cytoplasmique. C'est la grande homologie de séquence des NBDs conservée même entre les espèces qui sert essentiellement à définir l'appartenance d'un transporteur à la famille ABC.

- La plupart des transporteurs exportateurs sont constitués d'un homodimère regroupant deux hemi-transporteurs ou d'un monomères TMD fusionné à un domaine NBD. Certains transporteurs ABC ont des éléments complémentaires qui contribuent à la fonction de régulation de cette classe de protéines. En particulier, les importateurs ont une protéine à haute affinité de liaison (BP) qui s'associe spécifiquement avec le substrat dans le périplasme pour sa présentation au transporteur ABC approprié. Les transporteurs « exportateurs » n'ont pas la protéine de liaison, mais ont un domaine intracellulaire (ICD) qui relie les hélices transmembranaires et le domaine ABC. L'ICD est responsable de la communication entre le TMD et le NBD.

- Dans la plupart des cas, les transporteurs « exportateurs » ont leurs domaines transmembranaire N-terminal et les domaines C-terminaux ABC fusionnés en une seule chaîne polypeptidique, disposés selon la séquence TMD-NBD-DMT-NBD. Les transporteurs « importateurs » ont eux une organisation inversée, NBD-DMT-NBD-DMT, où le domaine ABC est N-terminal alors que le DMT est le C-terminal (figure 6).

Figure 5. Structure générale tridimensionnelle des protéines ABC de type « exportateurs » d'après Dawson et Locher[124].



TMD : Transmembrane domains, ABC (ATP Binding Cassette) ou NBD (Nucleotide Binding Domain), ICD : Intracellular Domain

Les transporteurs ABC jouent un rôle important en cancérologie[125].

- Efflux des agents anticancéreux :

Les transporteurs de la sous-famille ABCC sont ceux qui sont principalement impliqués dans le phénomène MDR de résistance aux agents anticancéreux. Il s'agit surtout d'ABCB1, ABCC1 (également nommés MRP1) et ABCG2 (aussi connu sous le sigle BCRP ou MXR). L'hyperexpression d'ABCB1 a été retrouvé comme facteur de résistance à la chimiothérapie dans plusieurs cancers (sein, colon, rein, foie, hémopathies)[126], celle d'ABCC1 dans le neuroblastome, les cancers bronchiques à petites cellules et certains cancers du sein[127], ABCG2 dans les hémopathies et cancers du sein[128], ABCC4 dans les hémopathies

- Facteurs pronostiques et cancérogenèse :

Par ailleurs il existe dans certains modèles de cancers un lien entre transporteurs de la famille ABC et l'agressivité tumorale (indépendamment de la réponse à la chimiothérapie). C'est le cas d'ABCC1 corrélé avec le degré de différentiation des hépatocarcinomes[129] ou la taille des cancers du sein[130], ABCC4 inversement lié à la différenciation des cellules leucémiques[131] ou ABCC3 dans les cancers bronchiques[132] ou pancréatiques[133]. ABCB1 est également corrélé au degré d'invasion vasculaire dans les cancers colorectaux[134] et le degré de différenciation des sarcomes des tissus mous[135]. Il a également été montré en pédiatrie que le taux de leucocytes dans les leucémies aigues myéloblastiques était lié au niveau d'expression d'*ABCA2*[136], que le risque de progression et d'évolution métastatique dans les neuroblastomes était lié à l'expression d'*ABCC4* malgré le fait qu'aucune des chimiothérapies utilisées dans cette maladie ne soit le substrat de ce transporteur[137]. Ces études observationnelles suggèrent un lien entre l'expression de certains transporteurs ABC et l'agressivité tumorale. Des études *in vivo* explorant la carcinogenèse tumorale notamment dans des modèles de cancers du colon (souris $Apc^{Min/+}$) retrouvent un lien entre *Abcb1* et l'existence de polypes suggérant donc qu'il existe dans certains modèles un lien entre la carcinogenèse tumorale et l'expression des transporteurs ABC[138].

- Apoptose et prolifération :

Il semble qu'ABCB1 joue un rôle anti apoptotique puisque son expression retarde l'apoptose dans les cellules ayant été exposées à un signal pro apoptotique[139] et par ailleurs l'inhibition d'ABCB1 se traduit par un signal pro apoptotique sur des lignées de cellules leucémiques[140]. C'est encore dans le neuroblastome qu'a été notée l'importance d'*ABCC1* et de sa perte dans l'obtention d'une apoptose in vitro[141] et in vivo ou de son inhibition dans la réduction de l'index mitotique[142].

- Migration, invasion et processus métastatique :

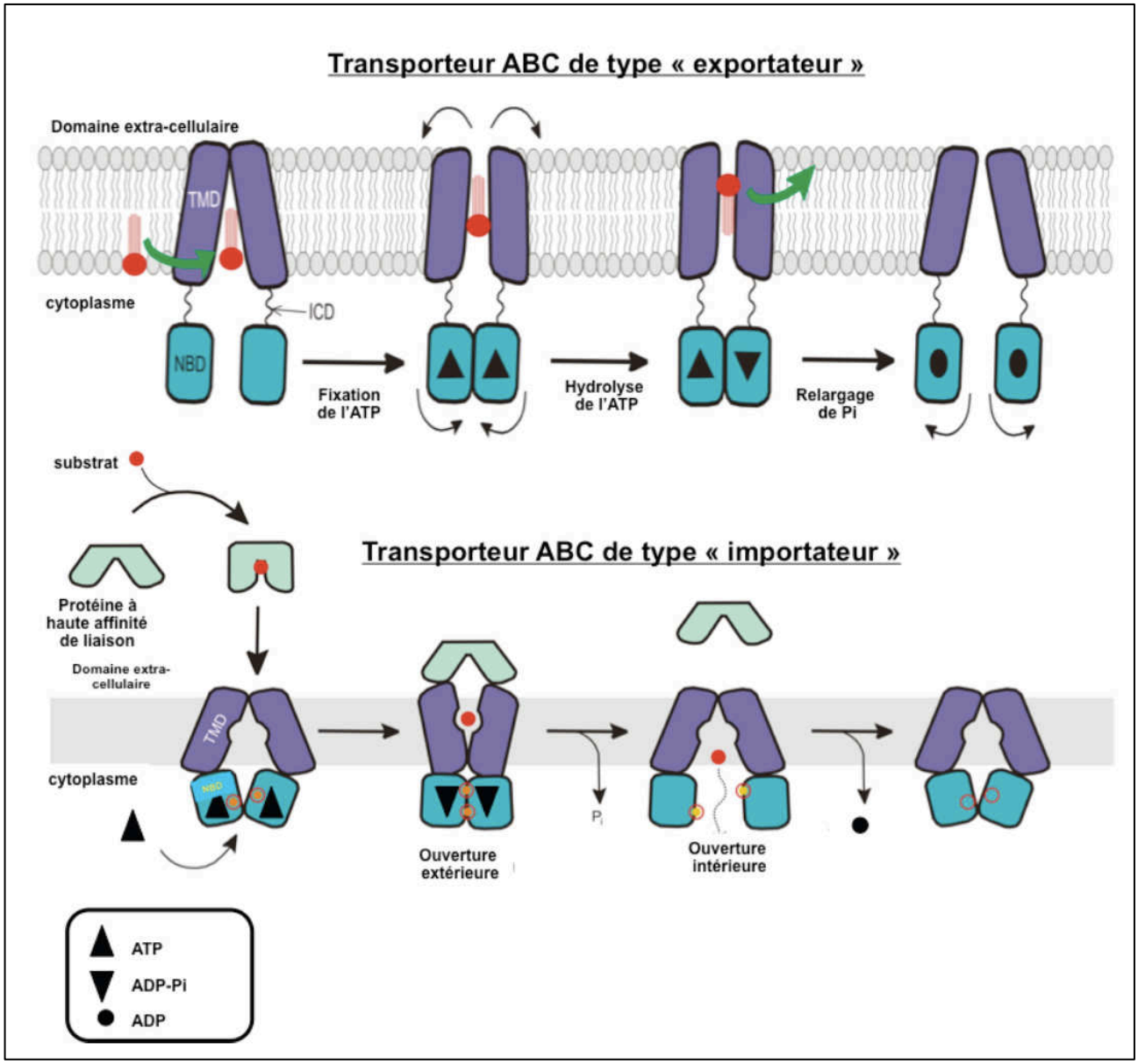
Plusieurs transporteurs ABC jouent un rôle dans la migration des cellules normales. Une réduction très nette de la migration des cellules dendritiques a été retrouvée chez les souris $Abcc1^{-/-}$[143] mais il semble qu'ABCC4 soit plus important encore qu'ABCC1 dans les phénomènes de migration cellulaire au sein de l'espèce humaine[144]. La réduction des taux d'*ABCB1* s'accompagne dans les lignées de cancers du sein MCF-7 d'une réduction de la migration et de l'invasion cellulaire[145]. Enfin l'expression d'ABCC1 et ABCC4 a été

comparée entre les sites de maladie initiale et métastatique ganglionnaire dans les cancers du sein[146] et les mélanomes[147] et il existe une différence nette d'expression de ces transporteurs présents de façon plus importante au niveau des sites métastatiques.

- Signalisation :

De nombreuses molécules de signalisation et notamment les prostaglandines, les leucotriènes et la sphingosine-1-phosphate (S1P) mais aussi le PAF (Platelet Activating Factor) ou les métabolites du cholestérol sont des substrats des transporteurs ABC[125]. L'importance de la voie des prostaglandines est établie dans la carcinogenèse colorectale mais également mammaire, hépatique ou bronchique[148]. Par exemple l'expression d'ABCC4 (transporteur de PGE_2) est augmentée dans les cellules de cancer colique[149]. En ce qui concerne la voie des leucotriènes, ABCC1 est le transporteur privilégié de LTC_4 et si sa déplétion réduit de manière importante la migration des cellules dendritiques comme nous l'avons vu, celle-ci est restaurée par l'apport exogène de leucotriènes suggérant l'importance d'ABCC1 dans ses phénomènes via le transport de LTC4[150]. En ce qui concerne S1P, son importance en cancérologie est grande puisqu'il s'agit d'une protéine de signalisation ayant une action angiogénique via la stimulation de la migration des cellules endothéliales et la promotion de formation de neo-vaisseaux[151]. Il est le substrat d'ABCA1 et d'ABCC1[125].

Figure 6. Mécanisme d'action des récepteurs ABC *d'après Dong et al*[152].



TMD : Transmembrane domains, NBD (Nucleotide Binding Domain), ICD : Intracellular Domain

Tableau 3 (partie 1). Protéines ABC. Principales caractéristiques et intérêts potentiel en cancérologie (ABCA et ABCB)

Famille ABC et exemples particuliers	Localisations physiologiques	Expression dans des lignées cellulaires	Agents anticancéreux substrats	Autres implications
ABCA / ABC1 *(12 membres identifiés à ce jour, étant la plupart des transporteurs transmembranaires de haut poids moléculaire)*				
ABCA1	nombreux tissus	ND	ND	Efflux des lipides et du cholestérol
ABCA2	SNC, coeur bronches, rein,	Cancers bronchiques Leucémies Aigues Myéloblastiques	Estramustine, mitoxantrone	Efflux du cholestérol
ABCA3	Bronches	Neuroblastome	anthracyclines	Efflux des phospholipides
ABCA4	Photorécepteurs rétiniens	ND	ND	Efflux N-retinylidene-PE
ABCB / MDR TAP *(11 membres identifiés à ce jour, dont 4 hémi-récepteurs et 7 récepteurs entiers)*				
ABCB1 MDR P-GP GP170	Ubiquitaire surtout au niveau des tissus ayant un rôle de barrière (foie, SNC, rein, intestin, placenta)	LAM Cancers bronchiques	anthracyclines, mitoxantrone, vinca alcaloïdes, imatinib, epipodophyllotoxines, camptothecines, colchicine, saquinivir, méthotrexate, docétaxel	Efflux de nombreuses substances dont le Platelet Activating Factor (PAF)
ABCB4	Foie	ND	Anthracyclines, mitoxantrone, vinca alcaloïdes, taxanes, epipodophyllotoxines	ND
ABCB5	Ubiquitaire	Mélanome	anthracyclines, camptothecines, thio purines,	ND
ABCB11	Foie	ND	taxanes	ND

Tableau 3 (partie 2). Protéines ABC. Principales caractéristiques et intérêts potentiels en cancérologie (ABCC)

Famille ABC et exemples particuliers	Localisations physiologiques	Expression dans des lignées cellulaires	Agents anticancéreux substrats	Autres implications
ABCC / MRP CFTR *(13 membres identifiés à ce jour)*				
ABCC1	**ubiquitaire surtout au niveau bronchique, testiculaire**	**Cancers épidermoïdes Cancers bronchiques Gliomes Leucémies Aigues Myéloblastiques**	**anthracyclines, mitoxantrone, vinca alcaloïdes, imatinib, méthotrexate epipodophyllotoxines, camptothecines, colchicine, saquinivir, docétaxel**	**efflux de LTC4, PGA2, 15d-PGJ2, PGE2, S1P**
ABCC2	**foie, intestin, rein**	**ND**	**anthracyclines, mitoxantrone, vinca alcaloïdes, cisplatine, taxanes, epipodophyllotoxines, camptothecines, saquinivir, méthotrexate**	**efflux de LTC4, PGD2, PGA1, PGE2**
ABCC3	**rein, intestin**	**ND**	**méthotrexate, epipodophyllotoxines**	**efflux de LTC4, 15d-PGJ2**
ABCC4	**ubiquitaire**	**ND**	**thio purines, méthotrexate, camptothecines, PMEA, AZT**	**efflux de LTB4, LTC4, PGA1, PGE1, PGE2, PGF1α, PGF2α, TXB2, cAMP et cGMP**
ABCC5	**ubiquitaire**	**ND**	**thio purines, méthotrexate, cisplatine, PMEA, AZT**	**efflux de cAMP et cGMP**
ABCC6	**rein, foie**	**ND**	**anthracyclines, cisplatine, epipodophyllotoxines**	**efflux de LTC4**
ABCC10	**niveau d'expression faible dans différents tissues**	**ND**	**vinca alcaloïdes, taxanes**	**efflux d'œstradiol et LTC4**
ABCC11	**faible dans différents tissus Sein**	**ND**	**thio purines**	**efflux de LTC4, cAMP et cGMP**

Tableau 3 (partie 3). Protéines ABC. Principales caractéristiques et intérêts potentiel en cancérologie (ABCD à ABCG)

Famille ABC et exemples particuliers	Localisations physiologiques	Expression dans des lignées cellulaires	Agents anticancéreux substrats	Autres implications
ABCD / ALD				
(4 membres identifiés à ce jour, tous des hémi-récepteurs localisés dans les peroxisomes)				
ABCE / OABP				
(1 membre qui est n'est pas un transporteur car sans domaine transmembranaire. ABCE1 est essentiellement localisé au niveau gonadique et splénique ayant une activité L ribonucléase)				
ABCF / GCN20				
(3 membres qui est ne sont pas des transporteurs car sans domaine transmembranaire. ABCF1 est régulée par le TNFα)				
ABCG / White				
(6 membres qui sont des hémi-transporteurs réversibles car sans domaine transmembranaire. ABCF1 est régulée par le TNFα)				
ABCG2	**Placenta** **Sein** **Foie** **Intestin**	**Cancers bronchiques** **Leucémies Aigues Myéloblastiques** **Cancers de l'œsophage** **Gliome** **neuroblastome** **cancers épidermoides** **mélanome** **cancer de l'ovaire** **carcinomes du nasopharynx**	**anthracyclines, mitoxantrone, imatinib,** **epipodophyllotoxines, camptothecines, méthotrexate,** **bisantrene, flavopiridol**	**efflux de cGMP**

1.3.2. ABCB1

1.3.2.1. ABCB1 du gène à la protéine

L'expression d'ABCB1 [(P Glycoprotéine (p-GP) ou Multi Drug Resistance 1(MDR1)] a été initialement décrite dans des lignées cellulaires tumorales, il y a plus de trente cinq ans, et associée à un phénotype dit MDR (*multidrug resistance*) [153]. Le phénotype MDR est caractérisé par l'existence d'une résistance cellulaire pléïotropique à plusieurs agents anti-cancéreux de structure différente et de cible intra-cellulaire distincte (anthracyclines, vinca-alcaloïdes, épipodophyllotoxines et taxanes). Cette résistance est liée à une diminution de l'accumulation intra-cellulaire de ces agents due à leur efflux par différentes protéines identifiées depuis cette découverte initiale, que sont en plus d'ABCB1 les protéines ABCC1 (Multidrug Resistance Protein 1 ou MRP1) et ABCG2 (Breast Cancer Resistant Protein ou BCRP)[154].
Depuis la découverte de ces protéines au sein de différents tissus non pathologiques[155,156] et notamment de leur implication dans la pharmacocinétique et la toxicocinétique des xénobiotiques à partir de modèles murins knock-out pour les gènes MDR[157], ces transporteurs appartiennent maintenant aux vastes domaines de recherche de la physiologie, de la pharmacologie et de la toxicologie.

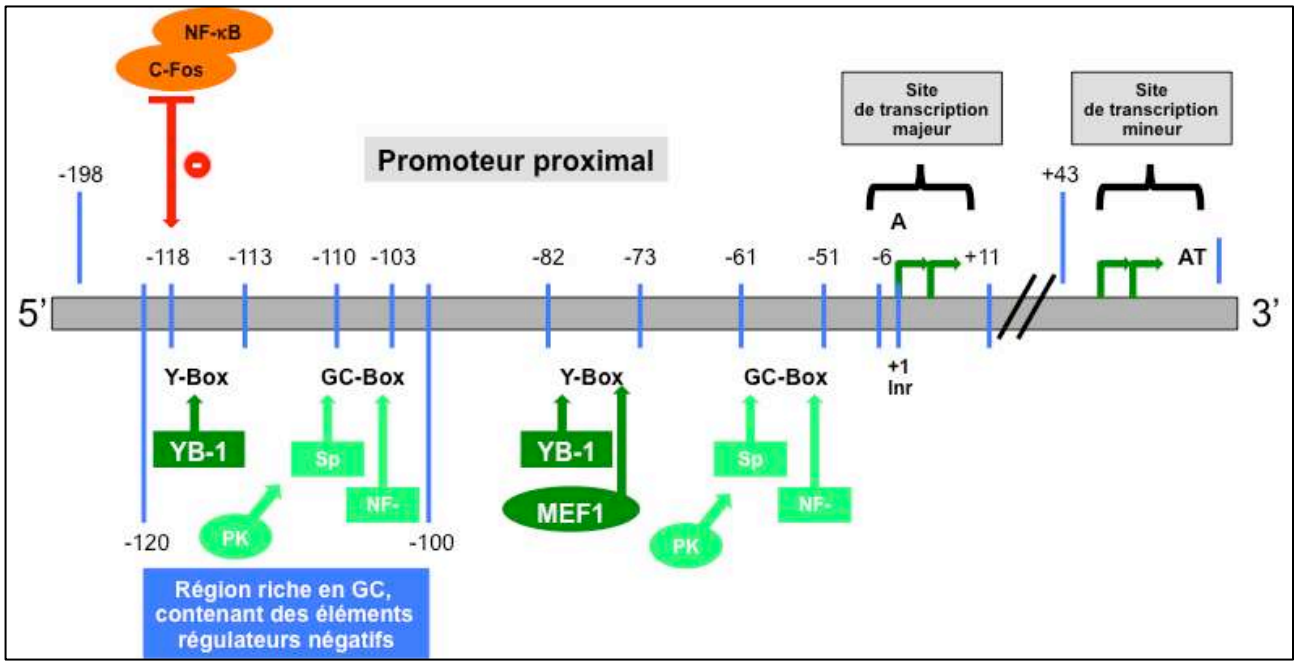
ABCB1 est le produit de gènes *MDR* appartenant à une famille de gènes fortement homologues[158]. Ces gènes sont adjacents et situés sur le bras long du chromosome 7[159]. Il existe deux gènes chez l'homme : le gène *MDR1 (ABCB1)* (classe I) et le gène *MDR2/3 (ABCB4)* (classe III). Chez les rongeurs les gènes *mdr* sont au nombre de trois : les gènes *mdr1a* ou *mdr3* (classe I) et *mdr1b* ou *mdr1* (classe II) et le gène *mdr2* (classe III). Seuls les gènes de classes I et II confèrent aux cellules le phénotype dit de résistance MDR[160] expliquant que le phénotype MDR soit lié à ABCB1 chez l'homme. Chez l'homme le gène *MDR1* est localisé sur le chromosome 7q21, et chez le rat, les gènes *mdr1a* et *mdr1b* sont situés sur le chromosome 4q11-12[161]. Les gènes murins partagent 80% d'homologie avec le gène humain *MDR1*[162,163]. *ABCB1* est un gène comportant 29 exons et 28 introns et près de 120kbp [159].
Les gènes MDR de la classe I sont régulés aussi bien par des contrôles transcriptionnels que post transcriptionnels (figure 7). Ainsi, la demi-vie de l'ARNm de MDR1 a été augmentée après traitement à l'arsénite de sodium [164] ou encore les taux d'ARNm de

mdr1a ont été augmentés après traitement de rats par des agents cytotoxiques ou par hépatectomie partielle[165]. Il existe une différence majeure entre le promoteur proximal du gène *MDR1* humain et celui des gènes *mdr1a/1b* murins. En effet, le site majeur de transcription des gènes murins est situé 23 pb en amont d'une TATA box[166], alors que le gène humain est dépourvu de TATA box. Il possède néanmoins une boite CCAAT et 2 boites GC [167]. Une région consensus AP-1 a été identifiée sur les gènes *mdr1a*, *mdr1b* murin et *MDR1* humain. Elle est capable de réagir avec c-jun et c-fos et est impliquée dans la réponse transcriptionnelle au stress chimique. Le promoteur des gènes *mdr1a/1b* semble également contenir 2 sites AP2 et un site de réponse aux glucocorticoïdes. La région promotrice comme beaucoup de promoteur sans TATA box contient une Y-box (CCAAT box inversée) capable de lier les facteurs de transcription YB-1 et NF-Y. NF-Y peut également se fixer sur la CCAAT box des gènes murins. De nombreux autres facteurs de transcription (NF-IL6, EGR1, HSF1, 4β-catenine, SXR, PXR, NF-κB, P53) participent à la régulation transcriptionnelle de ces gènes en réponse à des stress physico-chimiques divers [168]. Parmi ces facteurs, nous avons vu que certaines chimiothérapies comme le docétaxel pouvaient interagir avec SXR et/ou PXR et ainsi induire l'expression de MDR[99,100].

La régulation de l'expression des gènes *MDR* dans les cellules résistantes aux médicaments semble complexe. La surexpression des gènes dans les cellules cultivées chez lesquelles la résistance a été induite par des xénobiotiques semble principalement associée à une amplification génique [169]. Toutefois l'augmentation du nombre de copies des gènes *MDR* n'est pas le seul mécanisme de surexpression dans les lignées cellulaires résistantes et d'autres mécanismes tels que :

- l'existence de translocations t(4;7) servant même de modèle d'étude du phénotype MDR[170,171],
- le polymorphisme important dans l'expression du phénotype MDR[172]. Nous développerons dans le chapitre suivant ce sujet.

Figure 7 : Représentation schématique de la région promoteur de *MDR1* humain. D'après Grandjean-Forestier et al. [172]

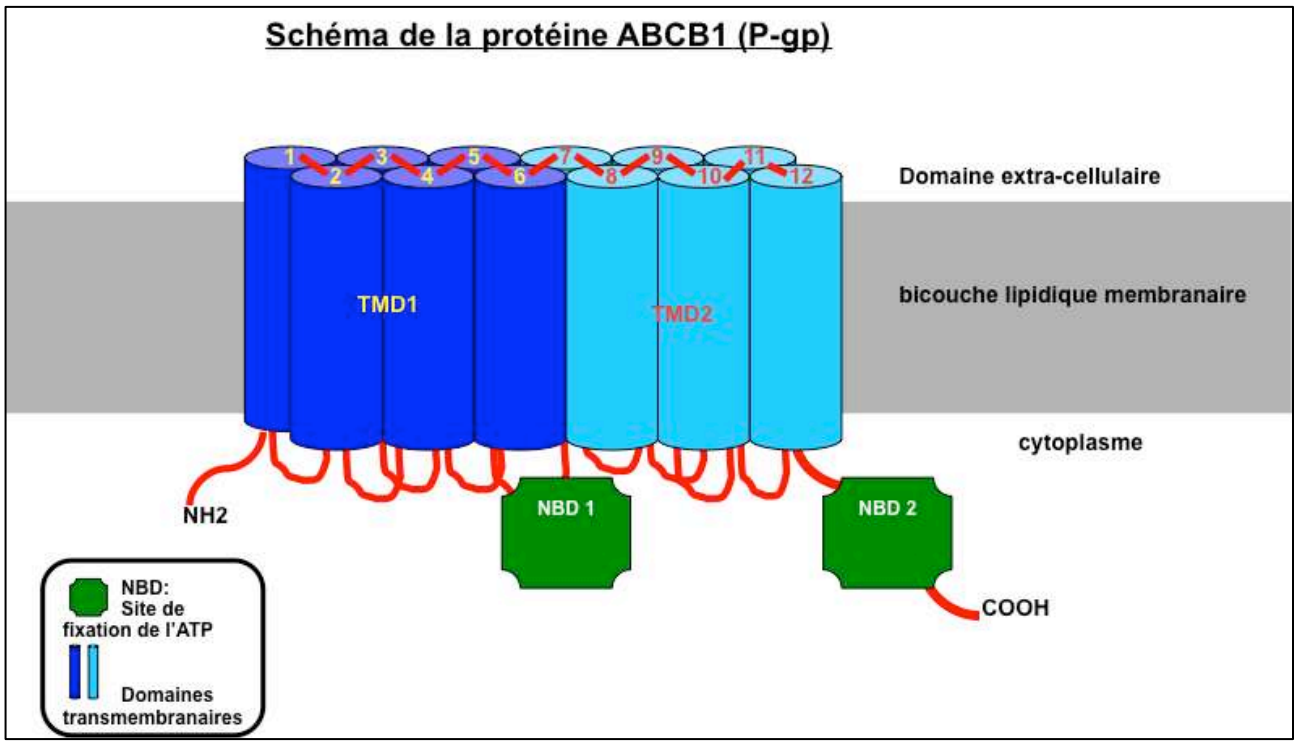


Les facteurs transcriptionnels positifs que sont YB-1 (Y-Box protein 1) et MEF1 (MDR1 promoter-enhancing factor) se fixent sur « Y-Box elements » (ou CCAAT-box-like). En revanche le complexe formé par les facteurs transcriptionnels NF-kB/c-FOS est un régulateur négatif de la transcription. Les boites GC (GC-Box) sont reconnues par les activateurs transcriptionnels NF-Y et Sp1 eux même activés par des voies de transduction impliquant des PKC (Protéines Kinases dont l'activité dépend d'AMPc). La séquence Inr (-6 à +11) est suffisante à elle seule comme promoteur transcriptionnel en l'absence d'une TATA-box.

Le séquençage du gène *MDR1*[173] a établi qu'il code pour une protéine de 1280 acides aminés formant un seul monomère, d'un poids de 150-170 kDa, comportant 12 domaines transmembranaires et deux sites de liaisons nucléotidiques. Ces derniers sont situés entre les domaines transmembranaires 6 et 7 et après le domaine transmembranaire 12. Ces domaines interagissent ensemble pour former, dans la membrane plasmique, un pore, possédant sur sa face cytoplasmique, les deux domaines de liaison à l'ATP (figure 8).
Les parties amino et carboxyterminale de la protéine se situent dans le cytoplasme. Les séquençages en acides aminés des deux moitiés de molécules sont étroitement similaires suggérant une pseudo-symétrie de la structure protéique. Les deux moitiés sont séparées par une région de liaison hautement chargée et qui est phosphorylée en différents sites

par une protéine kinase C. Ces phosphorylations ne sont pas indispensables au transport actif de molécules par la P-gp[174]. Les sites NBD de liaison à l'ATP sont composés de 3 régions conservées, un motif Walker A, un motif Walker B et un dodécapeptide hydrophobe qui représentent la signature des membres de la superfamille ABC, aussi appelé la liaison ou la région C[163].

Figure 8 : Représentation schématique des éléments constitutifs de ABCB1



TMD : Transmembrane domains, NBD (Nucleotide Binding Domain)

Les substrats de la P-gp sont si divers qu'il est difficile d'identifier des caractéristiques structurales communes. Ils sont nombreux, mais sont caractérisés par leur nature hydrophobe ou amphiphile et un poids moléculaire entre 80 et 2000 kDa parmi lesquels de nombreux agents anti-cancéreux[175]. Les substrats se lient aux domaines 6, 11 et 12 du pore, provoquant l'exposition des sites de liaison nucléotidique. Des expériences de photoaffinité avec des analogues de substrats marqués au tritium ou à l'iode 125 ont permis l'identification de deux sites de liaisons privilégiés des substrats de la P-gp[176]. Un des sites identifié se trouve dans la moitié N-terminale au niveau des domaines transmembranaires 4-6 et l'autre dans la moitié C-terminale au niveau des domaines transmembranaires 11-12[177]. Il y a 80% d'homologie en acides aminés entre les protéines MDR1 et MDR2 mais seul MDR1 confère le phénotype de résistance. Le remplacement

du domaine transmembranaire 12 de MDR1 par celui de MDR2 entraîne une perte du phénotype de résistance, ce qui souligne l'importance de ce domaine et de la boucle de liaison avec le domaine transmembranaire 11[178,179]. Une molécule d'ATP vient ainsi se lier sur un de ces domaines, provoquant un changement de conformation des domaines transmembranaires résultant en l'ouverture du pore et l'expulsion du substrat. Les domaines nucléotidiques fonctionnent de façon alternée, la liaison de l'ATP à un des sites inhibant le deuxième. Ainsi, la glycoprotéine P nécessite un ATP par substrat pour pouvoir l'expulser hors de la cellule[180-182]. Les substrats de la P-gp sont généralement lipophiles et diffusent facilement au travers des membranes plasmiques pour atteindre le cytoplasme par gradient de concentration. Le produit peut être expulsé à partir de la bicouche lipidique ou expulsé du cytoplasme dans la membrane et puis de la membrane dans le milieu extracellulaire. Un autre modèle, celui de la flippase, a été proposé par Higgins et Gottesman en 1992[183]. Le substrat est transporté activement par la P-gp du feuillet interne de la membrane plasmique au feuillet externe par un mécanisme de flip-flop, puis éliminé passivement du feuillet externe dans le milieu extracellulaire. Des études de photoaffinité et de binding ont mis en évidence des interactions directes entre la P-gp et de nombreux substrats [176,177]. D'autre part, les substrats stimulent l'activité ATPasique en proportion avec la capacité de la P-gp à transporter ces produits[184].

1.3.2.2. ABCB1 localisation et fonctions

Chez l'homme, la protéine a été détectée à des taux élevés dans le rein, le pancréas, les glandes surrénales et à des taux intermédiaires dans le foie[155]. Elle est également présente à des taux importants dans les cellules endothéliales du cerveau et des testicules[156] ainsi que dans le placenta[185]. Les deux gènes codant pour la P-gp chez les rongeurs ont une répartition originale. Le gène murin *mdr1a* est fortement exprimé dans l'intestin, le cœur, le cerveau, la moelle épinière, les poumons et les testicules[186]. Le gène *mdr1b* est lui par contre fortement exprimé dans les glandes surrénales, le rein, l'utérus de souris gravide, le placenta et le coeur[186]. Ces observations montrent bien que dans les circonstances physiologiques le niveau d'expression des gènes codant pour la P-gp est tissu dépendant, mais témoignant également de l'importance de la notion de « barrière » que jouent certains organes entre différents milieux.

La P-gp est donc présente au niveau de nombreuses structures assimilées à des barrières physiologiques, que ce soit entre le milieu extérieur et l'organisme ou entre le sang et les

structures protégées par des barrières hémato-tissulaires, telles que le cerveau. Globalement les fonctions de la P-gp semblent être orientées vers une limitation de l'exposition de l'organisme aux xénobiotiques, en limitant l'entrée des xénobiotiques dans l'organisme, puis en limitant l'accès de ces xénobiotiques aux structures « fragiles » protégées par les barrières hémato-tissulaires et enfin en favorisant l'efflux de ces xénobiotiques en dehors de l'organisme. Nous retiendrons ici trois barrières importantes permettant de maintenir la pérennité des espèces que sont la barrière hémato-neurologique, la barrière hémato-gonadique et materno-foetale et enfin la barrière hémato-métabolique.

- barrière hémato-neurologique

La barrière hémato-encéphalique, est une barrière physiologique présente dans le cerveau chez tous les tétrapodes et est responsable de l'homéostasie cérébrale en séparant le système nerveux central du sang. Les cellules endothéliales, qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées et qui tapissent les capillaires du côté du flux sanguin sont les composants essentiels de cette barrière. Ainsi, elle protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines de certaines hormones circulant dans le sang mais également complique le traitement médicamenteux d'un grand nombre de maladies. Seules les petites molécules lipophiles peuvent diffuser au travers des membranes plasmiques des cellules endothéliales des capillaires cérébraux pour atteindre le tissu nerveux, ce qui est le cas de la plupart des substrats de la P-gp. Un taux important de P-gp est présent à la face apicale (luminale) des cellules endothéliales[187], ainsi les substances qui entrent dans ces cellules endothéliales sont immédiatement refoulées dans le sang, diminuant la quantité de produits atteignant le tissu nerveux. Par contre, lorsque la P-gp est absente de la BHE la pénétration cérébrale de ses substrats est 10 à 100 fois supérieure chez les animaux knock out *mdr1a-/-* ou *mdr1a-/-/1b-/-*, déficient en P-gp, par rapport aux animaux sauvages et ceci avec parfois des conséquences importantes pour la toxicité locale du produit [157,188,189]. L'histoire retiendra que la découverte à l'origine de ce rôle de protection du SNC revient à Schinkel et son équipe en 1994, qui furent les premiers à développer des souris knock out *mdr1a-/-*. Ces animaux, bien que normalement viables et fertiles, ont développé une hypersensibilité à l'ivermectine 100 fois plus importante que les animaux sauvages. En fait pour des raisons de parasitisme dans l'animalerie, les animaux ont été traités par des pulvérisations d'ivermectine entraînant la mort de la quasi-totalité des

animaux mutants dans un tableau d'atteinte cérébrale majeure avec paralysie. Après expertise, il s'est avéré que les concentrations cérébrales en ivermectine étaient 90 fois plus importantes chez les souris knock out que chez les souris de souches sauvages[157].

La P-gp est également retrouvée au sein du tissu nerveux périphérique[190]. Les études conduites sur les souris knock out *mdr1a-/-* ont mis en évidence des taux plus importants de xénobiotiques dans les nerfs périphériques des souris mutantes par rapport à la souche sauvage. D'autre part, chez ces animaux knock out, l'ototoxicité induite par l'adriamycine a été augmentée par une combinaison avec la cyclosporine A, un puissant inhibiteur de la P-gp [191].

- barrière hémato-gonadique et materno-foetale

Plusieurs travaux ont permis de noter la présence de la P-gp sur la face luminale des cellules endothéliales bordant les capillaires sanguins testiculaires comme pour la barrière hémato-encéphalique[156,192] permettant de maintenir des concentrations inférieures de xénobiotiques dans les testicules[120]. Toutefois, des travaux plus récents soulignent non seulement l'importance potentielle de la P-gp dans différents tissus ovariens ou cancers[193,194] mais également l'influence des hormones oestrogéniques et progestatives sur son expression[195-197]. Par analogie on notera que la présence de la P-gp au niveau du placenta de souris gravides a conduit à l'hypothèse d'un rôle de protection du fœtus, contre les xénobiotiques assimilés par la mère[185]. Ce rôle de protection fut confirmé par la suite, puisque les souris knock out *mdr1a−/−* étaient plus sensibles à un dérivé de la classe des avermectines avec l'apparition anormale de fentes palatines chez les fœtus homozygotes mutants à l'inverse des fœtus homozygotes *mdr1a+/+*, un taux intermédiaire de fentes palatines fut observé chez les fœtus hétérozygotes *mdr1a−/+*[198]. Des études récentes retrouvent encore une fois le role potentiel des estradiols dans la régulation de la P-gp au niveau placentaire[196].

- barrière hémato-métabolique

La P-gp est très abondante dans la membrane des hépatocytes des canalicules biliaires et dans la partie apicale de l'épithélium de l'intestin grêle et du colon[155]. Le transporteur expulse ses substrats à partir des hépatocytes dans la bile et de l'épithélium intestinal vers la lumière intestinale. Comme de nombreux composés peuvent entrer dans les hépatocytes et dans l'épithélium intestinal à partir du compartiment sanguin, il en résulte une excrétion nette par la P-gp. Cette élimination via les selles entraîne une clairance plasmatique et une fonction de détoxification. Ces données ont été confirmées chez les

animaux knock out *mdr1a-/-*[199]. De la même manière, la P-gp au niveau intestinal limite le passage des xénobiotiques de la lumière intestinale dans la circulation sanguine générale. Comme de nombreux agents sont des substrats de la P-gp, la biodisponibilité orale de ces produits est limitée par la P-gp. Ceci a été vérifié avec l'augmentation de la biodisponibilité orale du paclitaxel[199] et du docétaxel[200].

La P-gp est très abondante dans la membrane des tubules proximaux rénaux mais les fonctions d'efflux des xénobiotiques du sang dans l'urine sont moins évidentes. Des études menées chez des souris knock out *mdr1a-/-/1b-/-* ont montré une augmentation de la clairance rénale, ce qui est contradictoire avec les résultats attendus d'une diminution de l'élimination rénale des substrats de la P-gp[201]. Cependant, on suppose que dans ces modèles plusieurs enzymes et éventuellement des transporteurs soient induits pour s'adapter au déficit en P-gp et qui selon les substrats étudiés pourraient entraîner des effets inverses[202].

On comprend donc que le dysfonctionnement d'ABCB1, de par sa fonction, peut avoir plusieurs répercussions cliniques.

Tout d'abord, la P-gp a un rôle dans la maladie d'Alzheimer. Il a été démontré que la bêta-amyloïde est un des substrats d'ABCB1 et que le récepteur contribue ainsi à l'évacuation de cette substance neurotoxique reconnue pour induire la maladie[203].

Il a également été démontré qu'ABCB1 est présent à la surface des lymphocytes CD4+ et CD8+ et qu'il entraînerait une résistance aux divers inhibiteurs de la protéase virale du VIH par excrétion de ceux-ci à l'extérieur de ces cellules. La protéine aurait donc un rôle dans l'échec de la trithérapie chez une proportion des patients atteint du SIDA[204].

Enfin la P-gp influence la biodisponibilité de nombreux médicaments, par le pompage de ceux-ci vers la lumière du système digestif. Ceux-ci pénètrent donc dans l'organisme de façon réduite et de ce fait, ne sont pas en mesure d'effectuer leur action. Cela est notamment le cas de la digoxine, du lopéramide, de la cyclosporine A et nombreux autres traitements[205]. Ce mécanisme est si important que de nombreuses voies de recherche depuis plusieurs années visent à contourner ce mécanisme de résistance [206].

Parmi les substrats de la P-gp on note un certain nombre d'agents anticancéreux[207], Les vinca alcaloides (vincristine et vinblastine), les anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), les anthracènediones (bisantrene et mitoxantrone), les taxanes (paclitaxel et docétaxel), les epipodophyllotoxines (etoposide et teniposide), les camptothecines

(irinotecan et topotecan) et certains inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib et le gefitinib.

1.3.2.3. polymorphismes d'ABCB1

La première étude systématique de « screening » des polymorphismes du gène *MDR1,* publiée en 2000, portait sur la totalité des 28 exons que comprend le gène, la région promotrice et les régions de jonction intron-exon[208]. Elle mettait en évidence l'existence de 15 polymorphismes qui sont tous des SNP. Des études complémentaires ont été réalisées depuis et au total ce sont plus d'une cinquantaine de polymorphismes qui ont été rapportés[161,209,210].

Il a été montré que la nature et surtout la fréquence des polymorphismes sont différentes selon l'origine ethnique de la population étudiée (Tableau 4)[209,211]. Dans la population caucasienne, si on exclut la région promotrice, le nombre de polymorphismes rapportés est de 21, 13 polymorphismes étant situés dans des exons (régions codantes) et 8 dans des introns[208-210]. La fréquence des variants alléliques est variable selon le polymorphisme étudié, la fréquence la plus faible étant de 0,2% (exon 26 : nucléotide 3320), la plus élevée de 46% (exon 26 : nucléotide 3435). Sur les 13 polymorphismes situés dans des exons, seuls 8 entraînent un changement de la séquence en acides aminés de la protéine P-gp. Ces polymorphismes peuvent non seulement modifier l'affinité du substrat pour la P-gp mais par voie de conséquence la pharmacocinétique de ce substrat et donc le rapport bénéfice/risque de certains médicaments substrats de ce transporteur. Les polymorphismes C1236T (rs1128503), G2677T/A ou G2677W (rs2032582) et C3435T (rs1045642) sont courants dans la population caucasienne (la plus étudiée) et entrainent une modification fonctionnelle de la P-gp[120]. Ces allèles sont situés respectivement au niveau des exons 12, 21 et 26. Ils entrainent une substitution de l'acide aminé qui est pour G2677W une Ala à la place de Ser/Thr en position 893[212] et pour C1236T une Ser à la place de Asn en position 400[213]. C3435T n'entraine pas de modification de l'acide aminé mais si elle modifie la fonctionalité de la P-gp [214].

Tableau 4. Fréquence génoypique de certains polymorphismes d'ABCB1 en fonction des populations.

Polymorphisme		Ethnies	Fréquence génotypique		
rs1128503	C1236T		CC	CT	TT
		Asiatique [215]	13%	46%	41%
		Euro-Caucasienne [209,210]	14%	48%	38%
		Afro-Américaine [209]	76%	22%	2%
		Hispanique[216]	28%	50%	22%
rs2032582	G2677W		GG	GW	WW
		Asiatique [215]	21%	60%	19%
		Euro-Caucasienne [209,210]	31%	50%	19%
		Afro-Américaine [209]	72%	22%	2%
		Hispanique[216]	31%	53%	16%
rs1045642	C3435T		CC	CT	TT
		Asiatique [215]	31%	51%	18%
		Euro-Caucasienne [209]	22%	50%	28%
		Afro-Américaine [209,210]	62%	34%	4%
		Hispanique[216]	30%	49%	21%

Une étude récente du polymorphisme d'ABCB1 a été réalisée au sein d'une population française de 227 personnes et retrouve sur 8 polymorphismes explorés des variations d'allèle et de génotype qui sont résumés dans le tableau 5. Les haplotypes les plus courants sont ceux avec les variants en positions 1236, 2677 et 3435 ainsi que leur forme sauvage[217]. La fréquence de ces polymorphismes est comparable en général à celle des populations caucasiennes explorées à l'exception du polymorphisme C3435T.

Tableau 5. Fréquence allélique et génotypique de certains polymorphismes d'ABCB1 dans la population française. D'après[217]

Polymorphisme	Fréquence génotypique			Fréquence allélique	
rs3213619	TT	TC	CC	T	C
T-192C	0.92 (206)	0.08 (18)	0.00 (0)	0.96	0.04
rs2214102	GG	GA	AA	G	A
G-1A	0.85 (192)	0.14 (32)	0.004 (1)	0.92	0.08
rs9282564	AA	AG	GG	A	G
A61G	0.83 (187)	0.16 (35)	0.01 (3)	0.91	0.09
rs2229109	GG	GA	AA	G	A
G1199A	0.89 (199)	0.10 (22)	0.01 (2)	0.94	0.06
rs1128503	CC	CT	TT	C	T
C1236T	0.33 (74)	0.49 (110)	0.175 (39)	0.58	0.42
rs1922242	TT	TA	TA	T	A
T-76A	0.30 (68)	0.49 (110)	0.21 (48)	0.54	0.46
rs2032582	GG	GW	WW	G	W
G2677W	0.28 (64)	0.52 (118)	0.19 (43)	0.55	0.45
rs1045642	CC	CT	TT	C	T
C3435T	0.28 (61)	0.52 (116)	0.20 (45)	0.54	0.46

W : T ou A

Le polymorphisme C3435T revêt un intérêt potentiel notamment en pharmacologie malgré le fait qu'il soit muet car n'entrainant pas de changement de la séquence en acide aminés de P-gp. En effet, différentes équipes ont montré qu'il existe un lien entre ce polymorphisme et :

- l'expression des transcrits du gène *MDR1*[218]
- l'expression de la protéine P-gp[208]
- la pharmacocinétique de différentes molécules dont on sait qu'elles sont transportées hors de la cellule par la P-gp, comme la digoxine[208] et des anti-rétroviraux[219]
- la réponse aux anti-rétroviraux[219]

Dans l'étude princeps de Hoffmeyer portant sur des volontaires (2000), le génotype CC est associé une expression plus élevée (d'un facteur 2) de P-gp dans les entérocytes (mesurée par immunohistochimie et Western blot) que le génotype TT, avec des niveaux d'expression intermédiaire pour le génotype hétérozygote CT. De plus, après prise de digoxine par voie orale, les paramètres pharmacocinétiques (Cmax, aire sous la courbe) sont plus bas pour le génotype CC que pour le génotype TT, et intermédiaires pour le génotype hétérozygote. L'ensemble de ces résultats est cohérent puisqu'une plus grande

quantité de P-gp au niveau des entérocytes, donc une moindre absorption de digoxine, est associée à une diminution des taux plasmatiques de cette molécule et inversement[208].
Dans un autre cadre, celui du traitement anti-VIH par le nelfinavir (anti-protéase), il existe également un lien entre le polymorphisme C3435T et le taux plasmatique de nelfinavir[219]. Cependant, à la différence de ce qui était rapporté par Hoffmeyer, c'est le génotype TT qui est associé aux taux les plus élevés[208].

Concernant le lien entre les polymorphismes de *MDR1* et le phénotype de ce gène, c'est-à-dire l'expression et/ou la fonction de P-gp, il existe relativement peu de données. Hormis l'étude princeps[208] portant sur les entérocytes (cf résultats ci-dessus) , l'expression ou la fonction ont été étudiées dans les leucocytes sanguins[218,219] et le placenta[220].
En ce qui concerne le polymorphisme C3435T, le plus étudié, le génotype CC est associé à hyperexexpression de l'ARN ou de la protéine dans les leucocytes sanguins[218,219] et le placenta[220]. Il est également associé à une augmentation de l'efflux de la rhodamine 123 dans les leucocytes sanguins[218].
L'influence des polymorphismes de *MDR1* sur la réponse à un traitement a été peu étudiée. Dans l'étude de Fellay, il existe une association entre le génotype CC (polymorphisme C3435T) et une augmentation plus faible du taux de lymphocytes CD4 que pour les génotypes CT et TT après initiation du traitement anti-rétroviral; l'augmentation des lymphocytes CD4 est un indicateur de réponse favorable puisque ces cellules sont la cible du virus VIH[219].
Au début de nos travaux, peu d'études avaient été réalisées portant sur les polymorphismes de *MDR1* et les agents anti-cancéreux. Seule, une étude récente portant sur la leucémie myéloïde aiguë retrouvait un lien entre le polymorphisme C3435T et la survie globale, le génotype CC étant celui associé à la survie la plus faible[221].

Au total, le polymorphisme C3435T du gène *MDR1* a été le plus étudié. Dans l'ensemble, les résultats des différentes études sont assez concordants. Ils montrent en règle générale une expression plus élevée de l'ARN ou de la protéine et une augmentation de la fonction P-gp pour le génotype CC comparativement aux autres génotypes (CT et TT). De plus, le génoytype CC semble plus péjoratif en terme de réponse au traitement (cas du traitement anti-rétroviral) ou de survie (cas de la leucémie myéloïde aiguë).

Depuis, plusieurs travaux dont les nôtres, ont confirmé l'intérêt potentiel de l'étude du polymorphisme de ABCB1 sur la réponse au traitement anticancéreux notamment avec les taxanes. Ceci sera discuté après la présentation de nos résultats.

1.3.3. ABCC1, ABCG2

Afin d'avoir une approche plus large concernant les mécanismes de résistance aux anticancéreux impliquant les protéines de la famille ABC, nous rappelons ici qu'en plus d'ABCB1/MDR1/P-gp deux autres protéines de la famille ABC participent au phénotype MDR. Il s'agit de ABCC1 ou MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein 1) et ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).

ABCC1 ou MRP1 (Mediated Resistance Associated Protein) a été la deuxième protéine des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) à être identifiée comme impliquée dans la résistance à la chimiothérapie. Elle fut découverte en 1992 par Cole et col. et sa distribution est considérée comme ubiquitaire[127]. Elle transporte de nombreux substrats dont l'un des plus importants est le glutathion aussi bien sous sa forme oxydée que non oxydée, élément essentiel assurant le co-transport d'autres substrats[222]. MRP1 a un mécanisme d'action globalement similaire à celui de la P-gp. Ce transporteur a comme substrats de nombreux xénobiotiques dont les toxines du tabac expliquant que certains polymorphismes soient associés aux risques de maladies pulmonaires liées au tabagisme[223]. Par ailleurs, l'expression d'ABCC1 joue un rôle crucial dans la réponse immune via la migration des cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques[143]. MRP1 confère également une résistance à des molécules anticancéreuses comme les vinca alcaloïdes (vincristine et vinblastine), les anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine) mais pas les anthracènediones, les épipodophyllotoxines (etoposide et teniposide), le methotrexate et certains inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib et le gefitinib. Les taxanes ne sont pas un substrat de MRP1[207].

ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) fut découverte via la sélection de clones tumoraux résistants à la mitoxantrone évoquant un mécanisme de type MDR mais non médié par ABCB1 ou ABCC1[224,225]. De façon concomitante, une autre équipe décrivit un récepteur placentaire de la famille ABC[226]. L'homologie fut établie et BCRP devint le troisième membre de la famille MDR. Ce transporteur est assez ubiquitaire mais il faut noter qu'il est exprimé de façon plus spécifique au niveau placentaire et au niveau de la

glande mammaire notamment pendant la lactation[225]. Par ailleurs, ABCG2 est exprimée au niveau des cellules souches hématopoïétiques[227] et son expression pourrait-être l'un des caractères phénotypiques servant à identifier les cellules souches[228]. Au delà de l'importance probable de l'identification et du ciblage de cellules souches, ABCG2 pourrait être un transporteur important en cancérologie. Son caractère pronostique dans certaines hémopathies (LAL et LAM) reste incertain[229,230]. Son expression dans plusieurs tumeurs solides a également été rapportée[231], mais aucune étude ne semble retrouver de corrélation entre son expression et le pronostic sous traitement dans les cancers du sein [232,233]. ABCG2 confère également une résistance à des molécules anticancéreuses comme les anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), les anthracènediones (bisantrène et mitoxantrone), les épipodophyllotoxines (étoposide et téniposide), les camptothécines (irinotécan et topotécan), le flavopiridol et certains inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib, le nilotinib, l'erlotinib, le canertinib et le gefitinib. Les taxanes ne sont pas un substrat d'ABCG2[207].

Souhaitant étudier l'impact des protéines MDR et de leur polymorphismes sur l'efficacité des traitements par anthracyclines et taxanes dans le cancer du sein, nous avons choisi donc la seule protéine ayant comme substrat le docétaxel et les anthracyclines (ABCB1) et la situation du cancer du sein non métastatique traité par chimiothérapie néoadjuvante.

1.4. Chimiothérapie néoadjuvante et cancers du sein

1.4.1. Principes de la chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein.

Différentes conférences de consensus et recommandations nationales et internationales ont tenté de définir les indications des traitements néoadjuvants des cancers du sein[234-237] _ENREF_4. Nous aborderons ici essentiellement les indications et modalités de ces traitements en excluant la question des traitements antihormonaux néoadjuvants pour lesquels à ce jour le niveau de preuve d'intérêt reste moindre malgré un intérêt en recherche[234-236] clinique[238]. Les dernières recommandations pour la pratique clinique de Nice St Paul de Vence que nous avons menées ont permis d'établir trois indications qui sont [239]:

- les tumeurs initialement inopérables d'emblée d'un point de vue carcinologique,
- les tumeurs initialement opérables mais non accessibles à un traitement chirurgical conservateur d'emblée,
- l'utilisation de l'approche néoadjuvante comme modèle de recherche clinique pour la personnalisation des traitements médicaux.

Les tumeurs initialement inopérables d'emblée d'un point de vue carcinologique [T4 (cancers inflammatoires et non inflammatoire) et/ou N2].

Elles représentent entre 5% et 10% des cancers du sein au moment du diagnostic initial. Le traitement néoadjuvant est alors proposé pour rendre possible une chirurgie carcinologique à la suite consistant dans la très grande majorité des cas en une mastectomie avec curage axillaire. L'approche néoadjuvante impacte la survie des patientes en rendant l'exérèse carcinologique possible et aucun essai de phase III n'a été à ce jour proposé pour valider cette indication qui est considérée comme un standard sur les données d'essais de phase II[234,240]. Par ailleurs, le pronostic des cancers du sein inflammatoire a ainsi rejoint celui des cancers localement avancés[241].

Les tumeurs initialement opérables mais non accessibles à un traitement chirurgical conservateur d'emblée.

L'appréciation de l'indication d'une mastectomie est multifactorielle et chirurgien-dépendante. Hormis les tumeurs histologiquement prouvées multicentriques (tumeurs dans 2 quadrants mammaires différents) ou celles infiltrant plus de deux quadrants mammaires (soit masse tumorale unique, soit microcalcifications tumorales étendues), une chirurgie conservatrice peut théoriquement s'envisager sous couvert d'obtenir des marges histologiquement saines. Par ailleurs, la prise en charge des tumeurs volumineuses ou multifocales est techniquement difficile non pas pour l'exérèse mais pour le remodelage glandulaire c'est-à-dire l'obtention d'un résultat esthétique satisfaisant. Cette dualité est parfaitement illustrée par les critères d'inclusion des phases III où sont mélangées très souvent des tumeurs allant de T1 à T3. Classiquement, une taille supérieure à 3 cm reste une indication de mastectomie et le critère d'inclusion des patientes dans la majorité des essais cliniques de phase III, même si les recommandations internationales admettent que toute patiente ayant une indication de chimiothérapie adjuvante est potentiellement candidate à une chimiothérapie néoadjuvante s'il existe un doute quand à la possibilité de réaliser un geste chirurgical premier conservateur[234]. On comprend donc qu'il puisse y avoir au sein de cette indication de traitement néoadjuvant des motivations d'ordre oncologique et des motivations d'ordre esthétique. Pour les premières le facteur limitant la chirurgie conservatrice est essentiellement lié à la taille tumorale et pour le second à la taille du sein et le rapport volume du sein/volume de la tumeur[234, 239].

L'utilisation de l'approche néoadjuvante comme modèle de recherche clinique pour la personnalisation des traitements médicaux.

Si l'approche néoadjuvante a historiquement permis d'optimiser la prise en charge carcinologique et esthétique des cancers du sein volumineux et/ou localement avancés, elle a également permis d'améliorer l'impact thérapeutique des traitements systémiques. En effet même si à ce jour il n'est pas démontré (en dehors des cancers carcinologiquement inopérables d'emblée) qu'une approche néoadjuvante ait modifié la survie d'une population particulière de cancers du sein il est démontré qu'elle n'a pas non plus d'effet délétère permettant son utilisation a des fins de recherche même en l'absence

d'indications carcinologiques et/ou à visée esthétique. L'analyse rétrospective des bases de données concernant les études néoadjuvantes a permis aujourd'hui de mieux identifier les populations sensibles aux thérapeutiques systémiques[242], ainsi que l'impact de ces thérapeutiques sur le taux de conservation mammaire[243] et le devenir de la maladie via l'obtention d'une réponse complète histologique. Cette approche s'est donc révélée être un outil prédictif et pronostique essentiel[244], particulièrement utile dans les approches de recherche clinique[234,239] voire pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques [245], allant même pour certaines remettre en question l'approche adjuvante sans approche néoadjuvante[246,247].

1.4.2. Les agents utilisés.

Sont exclus de ce chapitre les traitements antihormonaux néoadjuvants.

L'évolution des modalités de la chimiothérapie néoadjuvante a suivi 3 étapes majeures.
Une première étape consista à comparer et valider le fait que cette approche n'était pas moins efficace que la chimiothérapie adjuvante. Cette première étape a également permis de suggérer que l'obtention d'une réponse complète histologique (pCR) puisse être un *surrogate marker* de l'efficacité au long cours des schémas de traitement utilisés puisqu'il était fortement suggéré un lien entre pCR et survie [248,249] _ENREF_17.
La seconde étape a consisté en l'exploration de différents schémas de chimiothérapie permettant d'optimiser les modalités d'administration de la chimiothérapie néoadjuvante.
L'étape la plus récente consista à intégrer les thérapies ciblées antiHER2 en situation néoadjuvante associées ou non à la chimiothérapie néoadjuvante « classique ».

Les équipes françaises [250,251] et italiennes [252] furent les premières à démontrer la possibilité de transformer une indication initiale de mastectomie en chirurgie conservatrice après chimiothérapie néoadjuvante. Lors de la première étape, plusieurs essais randomisés de phase III ont comparé une chirurgie première suivie d'un traitement adjuvant contre une chimiothérapie néoadjuvante suivie de chirurgie (tableau 6). Ces essais avaient pour objectif d'évaluer l'impact de la chimiothérapie néoadjuvante sur la réduction du taux de mastectomies qui était donc souvent l'objectif principal des études.
L'essai randomisé le plus pur est celui de l'Institut Bergonié[253] qui explorait la place du traitement néoadjuvant uniquement pour des tumeurs relevant initialement d'une mastectomie. L'essai B-18 du NSABP a été le premier grand essai randomisé de phase III

à évaluer chez plus de 1000 patientes ces deux approches. Il a permis de conclure à un taux de réponse clinique de 80% après une chimiothérapie néoadjuvante qui comportait alors du cyclophosphamide et des anthracyclines[254].

La méta-analyse de Mauri, publiée en 2005, regroupe 4 000 femmes ayant participé à 9 essais prospectifs comparant chimiothérapie adjuvante et néoadjuvante. Elle montre qu'il n'y a pas de différence en terme de survie globale (SG) (HR = 1.00, IC95 = 0.90-1.12) ni en terme de survie sans rechute métastatique (SSRM) entre les deux modalités thérapeutiques[255]. Plus récemment, Mieog et al[256] ont conduit une même analyse de la littérature regroupant 5500 patientes ayant participé à 14 études randomisées. La SG est identique dans les deux groupes (HR = 0.98 ; IC95 = 0.87-1.09). Le taux de mastectomies est significativement inférieur dans le groupe des patientes ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante (RR = 0.71 ; IC95 = 0.67-0.75), sans que cela impacte la survie sans récidive locorégionale (SSRLR) (HR = 1.21 ; IC95 = 0.92-1.37), dans la mesure où l'on exclut de l'analyse les patientes qui n'ont pas reçu un traitement locorégional complet (chirurgie + radiothérapie).

Tableau 6: Essais de phase III de chirurgie première versus chimiothérapie néoadjuvante

	n	Critères inclusion	Type de chimio	pCR	Tx CC %	Tx RL %	SG %	Recul médian
INSTITUT BERGONIE [253]	**272**	**T>3cm**	**EVM-MTV**	**ND**	**0 / 63**	**32 vs 20 vs 22 NS**	**68 vs 64 NS**	**124 mois**
INSTITUT CURIE[257]	**390**	**T2-3 Preméno.**	**FAC x4**	**ND**	**77/82**	**27 NS**	**65 vs 60 NS**	**105 mois**
ROYAL MARSDEN HOSPITAL [258]	**293**	**T0-4 N0-1**	**MMM**	**7%**	**78 / 90 p<0.003**	**3 NS**	**63 vs 70 NS**	**10 ans**
NSABP B18 [254] [259]	**1493**	**T1-3**	**ACx4**	**13%**	**60/68**	**20 vs 18 NS**	**55 vs 55 NS**	**16 ans**
EORTC 10902 [260]	**698**	**T1-3**	**FEC60 x4**	**4%**	**26/40**	**10 vs 9,4 NS**	**82 vs84 NS**	**5 ans**
ECTO [261]	**1355**	**T> 2 cm**	**AT-CMF**	**20%**	**34/63 p<0.001**	**6 vs7 NS**	**84 NS**	**76 mois**

pCR : réponse complète histologique, Tx CC: taux de conservation chirurgicale, TxRL : taux de rechute locale, SG : Survie Globale

EVM : Epirubicine Vincristine Méthotrexate, MTV : Mitomycine, Vindesine, Thiotepa, FAC : 5Fluorouracile, Doxorubicine, Cyclophosphamide, MMM : Mitoxantrone, Mitomycine, Méthotrexate, AC : Doxorubicine, Cyclophosphamide, FEC60 : 5Fluorouracile, Epirubicine, Cyclophosphamide, AT : Doxorubicine, Paclitaxel , CMF : Cyclophosphamide, Methotrexate, 5Fluorouracile.

En dehors des conclusions sur les taux de conservation mammaire, certaines de ces études ont retrouvé rétrospectivement un lien entre la qualité de la réponse histologique de la maladie (au niveau du sein et/ou des ganglions axillaires) après traitement néoadjuvant et la survie (sans rechute et/ou globale) [248,262-267]. La qualité de la réponse histologique permettrait donc de disposer d'un paramètre pronostique supplémentaire et une évaluation de l'impact des chimiothérapies sur la survie dans une approche néoadjuvante, en émettant toutefois comme réserve que la définition de cette réponse histologique complète était parfois très différente d'une étude à l'autre, ce qui sera revu ultérieurement.

La seconde étape a consisté à comparer différents régimes et différentes stratégies de chimiothérapies néoadjuvantes dans des essais de phase III avec comme objectif principal le taux de pCR. La plupart des études concluent en fait à une amélioration de la pCR avec les nouveaux schémas de chimiothérapie intégrant les taxanes, plutôt administrés selon un schéma séquentiel et plutôt dans des populations déjà chimio-sensibles comme les cancers non hormono-dépendants et HER2 positifs (tableaux 7 et 8). Ces données ont permis de générer des hypothèses de travail en ce qui concerne la sélection des populations sensibles à un traitement néoadjuvant[242,268,269] et celles qu'il fallait possiblement écarter de cette approche[234-236].

Toutefois même si toutes ses études posent en théorie la question similaire de l'optimisation du traitement, elles sont très difficilement comparables les unes aux autres puisque :

- les modalités d'administration des taxanes sont différentes (concomitantes ou séquentielles, toutes les 3 semaines ou hebdomadaires) ;
- il existe des différences importantes de dose-intensité des anthracyclines, du cyclophosphamide, des taxanes ;
- il existe également des différences de durée de traitement entre les bras des études.

Au total, même s'il existe indiscutablement une amélioration de la pCR avec ces nouveaux schémas comparés aux anciens, peu d'études ont permis d'établir que la différence de taux de pCR était surtout due à l'adjonction d'une chimiothérapie au mécanisme d'action différent plutôt qu'à l'allongement de la durée d'un traitement dans une population sensible à la chimiothérapie. Seule l'étude du groupe d'Aberdeen a permis d'établir que non seulement l'adjonction de 4 cycles de docétaxel après 4 cycles d'une chimiothérapie néoadjuvante comportant des anthracyclines permettait d'augmenter le taux de réponse complète histologique mais surtout que c'est au sein de la population des patientes répondeuses cliniquement à ce premier traitement que l'amplitude du bénéfice du docétaxel était la plus grande, comme si l'efficacité à un premier traitement prédisait l'efficacité au second et inversement[270,271] et que la poursuite des anthracyclines dans une population sensible était moins efficace que le passage à un traitement par docétaxel.
L'étude Gepartrio qui a inclus des patientes présentant des cancers à différents stades a exploré dans le sous-groupe des patientes ayant des cancers inflammatoires et localement avancés l'impact d'une nouvelle stratégie néoadjuvante comparée à la poursuite de la même en cas de non réponse clinique après deux cycles d'une chimiothérapie néoadjuvante comportant du docétaxel de la doxorubicine et du cyclophosphamide. Cette étude ne retrouve pas non plus d'impact d'un changement stratégique dans cette population[272].

Ces essais successifs ont permis de confirmer notamment dans la population HER2:

- que la population HER2 bénéficiait plus de la chimiothérapie néoadjuvante en terme de pCR ;
- que par ailleurs l'adjonction d'un traitement antiHER2 à la chimiothérapie améliore le taux de pCR ;
- qu'actuellement la double inhibition HER2 améliore encore le taux de pCR ;
- qu'il semble que le trastuzumab reste le traitement de référence antiHER2 même si sa combinaison avec d'autres traitements ciblés est prometteuse.

En ce qui concerne la toxicité cardiaque de la combinaison anthracyclines et trastuzumab, si plusieurs études de phase II et III[273,274] ont conclu à la possibilité de réaliser cette association en situation néoadjuvante avec des données de tolérance cardiaque acceptable, un essai de phase I initié par le GETNA dont nous avons assuré la coordination a avorté conformément au conditions du protocole au terme de 7 patientes

incluses, du fait de la constatation lors de la première analyse de toxicité qu'il existait un sur risque de toxicité cardiaque jugé sur une baisse de la FEVG (rapport préliminaire essai GETNA 3, données personnelles non publiées). Une analyse récente des données regroupées des essais néoadjuvant concernant cette question a retrouvé également un sur risque de toxicité lié à cette association[275]. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les derniers essais néoadjuvant explorant l'optimisation du blocage antiHER2 ne comportent pas d'anthracyclines en association avec ces agents dans la phase néoadjuvante.

En résumé, les résultats des essais thérapeutiques en situation néoadjuvante de ces trente dernières années ainsi que l'évolution des stratégies thérapeutiques permettent à ce jour de retenir qu'une chimiothérapie de référence en situation néoadjuvante est une poly-chimiothérapie comportant des anthracyclines et des taxanes plutôt selon un schéma séquentiel. Un traitement antiHER2 en association aux taxanes permet par ailleurs d'améliorer l'efficacité dans la population HER2 positive. L'évaluation de l'action des traitements néoadjuvants est successivement passée d'un objectif carcinologique qui était de rendre opérable des patientes qui ne l'étaient pas à un objectif esthétique consistant à faciliter la conservation mammaire et finalement à un objectif pronostique en essayant d'augmenter le taux de réponse complète histologique corrélé à la survie dans au moins deux populations que sont les cancers du sein triple négatifs [276] et les cancers du sein HER2 positifs[277].

Tableau 7 : Principaux essais de phase II-III comparant deux schémas différents de chimiothérapie néoadjuvante

	n	Critères inclusion	Type de chimio	pCR %	Tx CC %	Tx RL %	SG %	Recul médian
NSABP B27[278,279]	2411	T1c - 3	AC / AC-D / AC puis D	14 / 26 p<0.001	62 / 63	8,5/ 4,7 5,5	75 / 75 NS	78 mois
ABERDEEN[270,271,280]	162	T>3cm ou N2	CVAP suivi de CVAP ou D	16 / 34 P=0.03	48 / 67	NR	78 / 97 p= 0.05	60 mois
MD ANDERSON[281]	174	T 1-3	FAC / P	8 / 17 p=0.11	40 / 53 p=0.3	NR	NR	23 mois
SICOG[282,283]	200	T3-4	CddpEP - EP	22 / 14 p=0.02	24 / 15	NS	82 / 69 p=0.07	74 mois
ACCOG[284]	363	T>3cm	AC / AD	24 / 21 NS	24 / 27	NR	84 / 86	32 mois
EORTC-NCIC-SAKK[285]	448	T4 et/ou N2,N3	FEC / EC (DD)	14 / 10 NS	NR	NR	53 / 51	66 mois
AGO[286]	567	T> 3cm	4EP / 6IDD	10 / 18 p=0.008	54 / 63 p=0.04	NR	77 / 83 p=0.041	55 mois
TOPIC[287]	426	T> 3 cm	AC / ECddpF	16 / 16 NS	63 / 66 p=0.19	NR	74 / 82 p=0.18	60 mois
GEPAR DUO[288]	915	T2-3 N0-2	AC-D / AD (DD)	14,3 / 7 p<0.001	63 / 58 p=0.05	NR	NS mais tendance	64 mois
GEPAR TRIO[272,289]	2090	T2-T4 N0-N2	DAC puis en function de la réponse clinique DAC / ViCa	NS	NR	NR	NR	NR
GEPAR QUATTRO[290,291]	1509	T1c-T4	EC-D/ EC-DCa / EC-D-Ca (Tzb si HER2+)	22,3 / 19,5 / 22,3 NS	NS	NR	NR	NR

pCR : réponse complète histologique, Tx CC: taux de conservation chirurgicale, TxRL : taux de rechute locale, SG : Survie Globale NR : Non rapporté NS : Non significatif

AC : Doxorubicine, Cyclophosphamide,D : CVAP : Cyclophosphamide, Vincristine, Doxorubicine, Prednisolone , D : Docétaxel, FAC : 5Fluorouracile, Doxorubicine, Cyclophosphamide, P : Paclitaxel ; CddpET : Cisplatine, Epirubicine, Pacliatxel, EP : Epirubicine, Paclitaxel, AD : Doxorubicine, Docétaxel, IDD : Schéma dose-intensité comportant Epirubicine et Paclitaxel avec G-CSF, ECddpF : Epirubicine, Cisplatine, 5Fluorouracile, EC : Epirubicine, Cyclophosphamide, Ca : Capecitabine, Tzb ; trastuzumab, ViCa : Vinorelbine, Capecitabine , DD : Dose Densité

Tableau 8 : Protocoles de chimiothérapie dans les cancers du sein HER2 positifs. Principaux essais explorant l'impact des traitements antiHER2 ou les stratégies d'association avec la chimiothérapie sur le taux de pCR.

	Phase	n	Critères inclusion	Type de chimio	pCR %
Essais explorant l'adjonction de trastuzumab à une chimiothérapie classique comportant des anthracyclines					
MD ANDERSON [292]	**II rand.**	**64**	**T1- 4**	**P-FEC / P+Tzb-FEC+Tzb**	**26 60***
Shimizu et al. [293]	**II rand.**	**125**	**T1-4**	**EC-wkP / EC-wkP+Tzb**	**24 50**
Pierga et al. [294]	**II**	**120**	**T1-4**	**EC-D / EC-D+Tzb**	**19 26**
NOAH [295]	**III**	**235**	**T1-4**	**AP-P-CMF / AP+Tzb-P+Tzb-CMF+Tzb**	**19 38***
GEPARQUATTRO [296]	**III**	**445**	**T1-4**	**EC+Tzb-D(+/-Ca) / EC+Tzb-D(+/-Ca)+Tzb**	**16 32***
GEPARQUINTO [274]	**III**	**620**	**T1-4**	**EC+Tzb-D+Tzb / EC+Lp-D+Lp**	**31* 22**
Essais explorant l'adjonction de trastuzumab à une chimiothérapie ne comportant pas d'anthracyclines					
Guiu et al. [297]	**II**	**69**	**T1-4**	**D(+/-Cbcda)+Tzb**	**39**
Harris et al. [298]	**II**	**40**	**T3-4**	**Vi+Tzb**	**20**
Wildiers et al. [299]	**II**	**50**	**T4 N2-3**	**DCa+Tzb**	**40**
Essais explorant la double inhibition HER2					
NEOALTTO[300]	**III**	**455**	**T2-4**	**wkP+Lp wkP+Tzb wkP+Tzb+Lp**	**20 28 47***
NEOSPHERE[301]	**II**	**417**	**T2-T4**	**D+Tzb D+Pzb D+Tzb+Pzb Tzb+Pzb**	**29 24 46* 17***

* : différence statistiquement significative avec le bras de référence,
pCR : réponse complète histologique,
Tzb ; trastuzumab ; Lp : Lapatinib ; Pzb : Pertuzumab
P : Paclitaxel ; wkP : Paclitaxel hebdomadaire ; D : Docétaxel ; Vi : Vinorelbine ; Ca ; Capécitabine ; Cbdca : Carboplatine ; CMF : Cyclophosphamide, Méthotrexate, 5Fluorouracile ; EC : Epirubicine, Cyclophosphamide, FEC 5Fluorouracile, Epirubicine, Cyclophosphamide

1.4.3. Evaluation de l'action.

Les modalités d'évaluation des traitements néoadjuvants dépendent des objectifs de la chimiothérapie néoadjuvante.

- Si l'objectif est celui de rendre la tumeur accessible à un traitement chirurgical carcinologique alors l'évaluation portera sur la réduction tumorale et la possibilité de réaliser un traitement chirurgical.
- Si l'objectif est celui d'éviter une mastectomie, alors l'évaluation portera également avant tout sur la réduction tumorale mais en précisant les possibilités de réaliser un traitement conservateur après chimiothérapie néoadjuvante.
- Si l'objectif est d'améliorer le pronostic de la maladie en sélectionnant des populations sensibles aux traitements alors l'évaluation portera sur le taux de pCR puisqu'il est corrélé à la probabilité de guérison via la survie sans récidive et la survie globale

Par ailleurs, s'il n'est pas démontré à ce jour de différence de survie entre stratégie néoadjuvante et adjuvante pour les tumeurs opérables d'emblée, il est essentiel de s'assurer de l'absence de progression tumorale sous traitement.

On conçoit donc que les informations fournies par l'approche néoadjuvante permettent d'établir :

- les critères prédictifs de réponse en fonction des critères initiaux de la tumeur et/ou de la patiente,
- le pronostic de la maladie après chimiothérapie néoadjuvante suivie de chirurgie en fonction du résidu tumoral après traitement et potentiellement de la tumeur initiale.

L'évaluation de l'action de la chimiothérapie néoadjuvante est classiquement réalisée pendant le traitement utilisant l'examen clinique et des moyens d'imagerie. Toutefois l'efficacité carcinologique de la chimiothérapie néoadjuvante est jugée par l'analyse anatomopathologique du résidu tumoral via le taux de pCR.

Suivi de la réponse sous traitement

L'intérêt théorique de pouvoir prédire la qualité de la réponse finale serait de modifier la stratégie thérapeutique dès la fin de la première cure (modification du protocole de chimiothérapie néoadjuvante ou intervention chirurgicale immédiate). Cependant, il faut pondérer l'intérêt de cette évaluation car la plupart des schémas de chimiothérapie sont de type séquentiel, la réponse n'étant évaluée qu'à la fin des deux phases et il n'existe que peu de preuves d'un niveau suffisant indiquant l'intérêt de modifier le protocole en cas de maladie peu réactive afin d'améliorer le taux de pCR[271,272].

L'examen clinique reste essentiel[262]. L'étude Geparduo a cependant permis de montrer les limites de ce dernier en ce qui concerne sa sensibilité et sa corrélation à la réponse histologique[302].

L'imagerie a donc toute sa place. La mammographie a une sensibilité supérieure à l'examen clinique, mais avec un taux de faux positifs souvent plus important. Cette évaluation est fiable si, sur la mammographie initiale, il existe une masse (avec des contours clairement définis sur au minimum 50% de la surface) et/ou des microcalcifications associées. Cependant, la persistance de microcalcifications sur l'examen final ne préjuge pas de la persistance de lésions résiduelles. L'évaluation n'est pas fiable en cas de distorsion architecturale ou de masse à contours masqués sur plus de 50% de la circonférence[303]. L'échographie mammaire présente également des résultats controversés. La meilleure corrélation est obtenue lorsque la lésion est hypoéchogène par rapport aux tissus adjacents (aspect fréquent dans les seins denses en mammographie), ce qui rend les deux examens très complémentaires. L'échographie est peu fiable pour estimer les réponses fragmentées notamment si les lésions mesurent moins de 7mm[304]. L'apport du doppler couleur semble intéressant puisqu'il augmenterait la sensibilité et la valeur prédictive négative lors de l'évaluation finale mais avec comme limite la faible reproductibilité de la technique.
Les études publiées et colligées dans le travail récent de l'EUSOMA confirment toutes la supériorité de l'IRM pour évaluer la réponse thérapeutique comparativement à l'examen clinique ou au bilan conventionnel mammo-échographique[305]. Les modes de réponse en IRM sont de 3 types : absence de rehaussement, diminution concentrique de taille du rehaussement initial ou aspect fragmenté de la réponse avec présence en lieu et place de

la lésion primaire de rehaussements multiples souvent de petite taille. Dans ce dernier cas, l'évaluation de la taille résiduelle est peu fiable et ce type de réponse doit inciter fortement à la réalisation d'un geste radical. Par ailleurs, l'aspect morphologique de la lésion initiale peut apporter des éléments pronostiques en faveur d'une réponse comme une masse de grande taille présentant un hyper-signal central en pondération T2 (évocateur de nécrose) ou un rehaussement en masse homogène. En revanche, la présence d'un rehaussement multi nodulaire ou une prise de contraste « non-masse » auront statistiquement moins de chance d'évoluer vers une pCR sous traitement[306]. La diminution de plus de 30% de la taille tumorale (selon les critères RECIST) après le premier cycle de chimiothérapie néoadjuvante est un argument en faveur de l'obtention d'une pCR[307]. Pour Partridge et al, le volume tumoral (calculé en délimitant le rehaussement sur chaque coupe et en sommant le nombre de pixels obtenus par coupe) est un élément plus prédictif que l'estimation sur 2 dimensions de la taille tumorale (critères OMS)[308]. L'absence de réponse après un ou deux cycles de chimiothérapie néoadjuvante est un élément fiable surtout pour définir les patientes mauvaises répondeuses (mais l'examen clinique et l'imagerie conventionnelle le font aussi très bien) comme l'ont montré l'équipe de Loo et al sur 54 patientes ou une diminution de moins de 25% après 2 cycles prédisait l'absence de réponse complète dans 95% des cas[309].
Il existe également dans plus de 80% des cas une corrélation entre l'intensité du rehaussement initial et le volume tumoral résiduel[310]. Une étude récente a montré que l'IRM de diffusion (sans injection de produit de contraste) permettait de détecter de manière aussi sensible que l'examen injecté la présence d'un reliquat tumoral (96 % versus 89%)[311]. En revanche, la quasi-totalité des travaux sont en accord pour considérer que le coefficient de diffusion apparent (ADC) n'est pas un élément permettant, avant la mise en place de la chimiothérapie néoadjuvante, de faire un tri entre les patientes potentiellement répondeuses ou non[311,312].

Enfin, l'imagerie métabolique par scintigraphie au 18-FDG semble également intéressante en ce qui concerne l'évaluation précoce de la réponse au traitement. Cette technique permet tout d'abord une meilleure stadification de la maladie initiale permettant de mieux détecter les maladies métastatiques non diagnostiquées par les techniques standard[313]. La scintigraphie au 18-FDG et son évolution après traitement avant le second[314] ou le troisième cycle[315,316] semble prédictive de la réponse sous traitement et corrélée à la pCR

comme le retrouve les données d'une méta-analyse récente reprenant les données de 19 essais ayant étudiés chez 920 patientes le lien entre la variation de SUV sous chimiothérapie néoadjuvante et la réponse complète histologique[317]. Les auteurs retrouvent pour cet examen une sensibilité de 84%(IC 95%, 78-88%), une spécificité de 66%(IC 95%, 62-70%), une valeur prédictive positive de 50%(IC 95%, 44-55%) et une valeur prédictive négative de 91%(IC 95%, 87-94%). Par ailleurs, il semble qu'une étude de la décroissance précoce (après un ou deux cycles) du SUV soit plus intéressante en terme de prédiction de réponse qu'une évaluation retardée (précision de 76% vs. 65%, p = 0.001). La TEP-TDM au 18-FDG semble donc même supérieure à l'imagerie mammaire classique et l'évaluation précoce de la réponse pourrait permettre à l'avenir non seulement de prédire les tumeurs sensibles au traitement avec une probabilité élevée de pCR mais encore plus d'identifier les tumeurs peu sensibles permettant d'envisager des stratégies thérapeutiques avec d'autres classes thérapeutiques notamment dans les essais de thérapies ciblées[314,315,318,319].
Par ailleurs, l'imagerie métabolique semble également corrélée aux caractéristiques anatomopathologiques et moléculaires de la tumeur mammaire qui sont également des paramètres prédictifs de réponse tumorale[320,321].

Les nouvelles techniques de biologie moléculaires ont permis d'identifier des sous-groupes tumoraux au sein desquels la sensibilité à une chimiothérapie, notamment néoadjuvante est différente[2]. En effet, il semble que les populations triples négatives et HER2 positives soient les plus sensibles à un traitement par chimiothérapie[322], par ailleurs, en dehors du type moléculaire, les cancers de grade élevé, non hormonodépendants, HER2 positifs, proliférants et plutôt de petite taille chez une patiente jeune ont plus de probabilité de répondre à une chimiothérapie que les autres[242,268,323-325].

Evaluation de la réponse complète histologique

Le taux de pCR est très variable entre les études s'établissant de 4 à 30% en fonction du type de tumeurs initiales (cancer opérable d'emblée ou non), des cytotoxiques utilisés, de la finesse de l'analyse histologique (coupe de 0,5 ou 1 mm) et de la notion de réponse axillaire associée ou non. Toutefois, il est essentiel de noter que la définition même de pCR peut différer d'une étude à l'autre comme il est rappelé dans le tableau 9 et la valeur

pronostique de la pCR est surtout liée à l'absence de résidu tumoral invasif tant au niveau de la tumeur mammaire que des ganglions axillaires du curage.

1.4.4. Bénéfices et intérêts.

Si l'on devait au final résumer les bénéfices de la chimiothérapie néoadjuvante, il faudrait noter dans l'ordre

- la possibilité de réaliser un traitement locorégional carcinologique et curatif chez des patientes présentant un cancer localement avancé et/ou inflammatoire,
- la possibilité d'avoir un traitement chirurgical conservateur en cas de cancer volumineux,
- la possibilité d'avoir une évaluation prédictive et pronostique d'un traitement systémique en situation non métastatique en étudiant le taux de réponse complète histologique et ainsi explorer les hypothèses biologiques de sensibilité ou résistance aux traitements administrés.

Au delà de l'intérêt de ces traitements chez des patientes curables, le modèle néoadjuvant représente l'un des moyens les plus « élégants » d'explorer non seulement les différentes options de traitement systémique mais également les comparer entre elles. Par ailleurs, l'exposition de la tumeur primitive et son hôte à des agents thérapeutiques à un stade relativement précoce de la maladie permet idéalement d'étudier l'influence de paramètres biologiques de la tumeur et de l'hôte sur la réponse au traitement. Il nous a donc sembler particulièrement intéressant d'utiliser ce modèle afin d'étudier l'impact potentiel de la pharmacogénomique sur la réponse à la chimiothérapie par le docétaxel.

Tableau 9 (partie 1). Evaluation de l'efficacité carcinologique de la chimiothérapie néoadjuvante via le taux de pCR.

	Réponse complète histologique **pCR et impact pronostique démontré**	**Absence de réponse complète histologique**
Aberdeen	- Grade 5 : absence de résidu tumoral invasif au niveau de la pièce de résection mammaire et des ganglions axillaires situé à l'endroit ou la tumeur était initialement présente **Impact pronostique sur la SSM et la SG**	- Grade 1: altérations cellulaires tumorales sans diminution de taille - Grade 2: diminution mineure du nombre de cellules invasives avec cellularité tumorale active toujours présente - Grade 3: réduction modérée de la cellularité tumorale allant jusqu'à 90% - Grade 4: disparition quasi complète de l'activité tumorale invasive avec persistance de quelques « clusters »
AJCC	Stade 0 : absence de résidu tumoral invasif au niveau de la pièce de résection mammaire et des ganglions axillaires.	Stade I à III : stadification en fonction de la classification pTpN après CNA et classement en stades Le pTpN après traitement néoadjuvant est dénommé yTyN
Chevallier	Classe 1 : Disparition de toute tumeur invasive et *in situ* dans le sein et les ganglions	- Classe 2 : présence de résidu in situ dans le sein sans autre cancer invasif dans le sein ou les ganglions - Classe 3 : présence d'un résidu tumoral invasif avec altération stromale (sclérose ou fibrose) - Classe 4 : pas ou peu de modification du cancer invasif
EORTC	Absence de résidu tumoral dans le sein et les ganglions **Impact pronostique sur la SG**	Tumeur résiduelle
German Breast Group	- Grade 5 : Aucun résidu tumoral viable (invasif ou non invasif) dans le sein et les ganglions. - Grade 4 : Pas de résidu tumoral viable dans le sein mais présence de ganglions envahis **Impact sur la SSM et la SG**	- Grade 3 : Résidu tumoral viable non invasif dans le sein uniquement - Grade 2 : Un ou plusieurs résidus tumoraux viables dans le sein ≤ 5 mm - Grade 0-1 : autres situations
Institut Curie (Pierga)	Absence de résidu tumoral invasif dans le sein et les ganglions **Impact pronostique sur la SSM et la SG**	Tumeur résiduelle

Tableau 9 (partie 2). Evaluation de l'efficacité carcinologique de la chimiothérapie néoadjuvante vie le taux de pCR.

	Réponse complète histologique **pCR et impact pronostique démontré**	**Absence de réponse complète histologique**
M.D. Anderson	Absence de résidu tumoral invasif au niveau de la pièce de résection mammaire et des ganglions axillaires. La présence d'un carcinome *in situ* ne modifie pas la classification **Impact pronostique sur la SSM et la SG**	Distinction entre résidu tumoral : - ≤ 1 cm^3 (incluant les résidus focaux à type de cellules isolées) - > 1 cm^3
Milan Cancer Institute	Absence de résidu tumoral invasif dans le sein	Distinction entre: - bonne réponse tumorale avec >50% de réduction de la taille tumorale - réponse mineure ou absence de réponse en cas de réduction tumorale ≤ 50%
Sataloff	Prise en compte de la tumeur mammaire et des ganglions axillaires T-A/N-A ou T-A/N-B - T-A : disparition de tout cancer invasif ou résidu < 5% de la surface tumorale initiale (sous forme de *foci* diffus ou sur un seul site). - N-A : pas de métastases ganglionnaires, effet thérapeutique total - N-B : pas de métastases ganglionnaires, pas d'effet thérapeutique **Impact pronostique sur la SG**	- T-B : effet thérapeutique estimé > 50% - T-C : présence d'un effet thérapeutique mais ≤ 50% - T-D : pas d'effet thérapeutique - N-C : effet thérapeutique mais présence de métastases ganglionnaires - N-D : pas d'effet thérapeutique sur les métastases ganglionnaires

2. Expérimentation

« Les faits n'appartiennent tous qu'au problème, non à sa solution. »

Ludwig Wittgenstein (1889-1951) *in Tractatus logico-philisophicus*

2.1. Objectifs de l'étude

Compte tenu de l'importance de l'utilisation des anthracyclines et des taxanes en cancérologie mammaire et de la possibilité d'une variation inter-individuelle de la réponse à ces chimiothérapies nous avons souhaité explorer le lien potentiel entre la biodisponibilité de ces médicaments et leur efficacité. Sachant par ailleurs que cette biodisponibilité est elle-même influencée par certains polymorphismes du gène *MDR1* codant pour la P-gp à l'origine de l'efflux de ces deux médicaments, nous avons souhaité explorer le lien existant entre ces polymorphismes et la réponse à la chimiothérapie. Nous avons choisi le modèle néoadjuvant car il existe comme nous l'avons évoqué ci-dessus une corrélation entre la qualité de la réponse anatomopathologique et le pronostic de la maladie après traitement ce qui permettrait donc d'évoquer un lien entre polymorphisme de MDR1 et le pronostic après traitement.

Les hypothèses que nous souhaitions tester étaient donc:

- hypothèse principale : les polymorphismes du gène *MDR1* sont susceptibles de jouer un rôle dans la pharmacocinétique des anthracyclines/taxanes.
- hypothèse secondaire : les polymorphismes du gène *MDR1* sont susceptibles de jouer un rôle dans la réponse aux anthracyclines/taxanes de patientes atteintes de cancers du sein

Dans ce but nous avons élaboré un de protocole de recherche clinique pour lequel une demande de soutien a été soumise à l'appel d'offre du PHRC régional en 2003. Après acceptation, ce protocole sous la coordination scientifique du Dr Anne Fajac (Laboratoire d'Histologie Biologie Tumorale du Pr Jean-François Bernaudin, APHP Tenon) et la coordination médicale du Dr Joseph Gligorov (Service d'Oncologie Médicale du Pr Jean-Pierre Lotz, APHP Tenon) a été soumis au Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales en 2004, et après avis favorable et ouverture des centres participant à l'étude, l'inclusion des patientes c'est déroulée jusqu'en 2008. Les objectifs du protocole ont été définis de la façon suivante :

- L'objectif principal était de tester si certains polymorphismes du gène *MDR1* sont associés à une variabilité dans la réponse aux anthracyclines/taxanes de patientes atteintes de cancer du sein. Nous avions pris pour parti de nous limiter aux polymorphismes du gène *MDR1* répondant aux critères suivants : fréquence

supérieure à 10% et situation dans des exons. Le critère de réponse était la réponse histologique après chimiothérapie néoadjuvante, évaluée sur la pièce chirurgicale de façon centralisée.

- L'objectif secondaire était de tester si ces mêmes polymorphismes du gène *MDR1* sont associés à une variabilité dans la pharmacocinétique des anthracyclines/taxanes.

2.2. Protocole

2.2.1 Choix du plan d'expérimental-justification

Pour chaque patiente d'origine caucasienne incluse dans l'étude étaient réalisés :
- l'évaluation de la réponse aux agents anti-cancéreux (doxorubicine/docétaxel),
- le génotypage du gène *MDR1,*
- l'étude pharmacocinétique des agents anti-cancéreux (doxorubicine/docétaxel).

2.2.1.1. Choix du protocole de chimiothérapie (doxorubicine/docétaxel)

Afin de pouvoir correctement évaluer la réponse à la chimiothérapie, l'étude n'a concerné que les situations néoadjuvantes non métastatiques et afin de pouvoir prendre en compte, dans l'analyse de la réponse, chaque classe d'agent anti-cancéreux (anthracyclines/taxanes), nous avons opté pour un schéma d'étude séquentielle (anthracyclines puis taxanes). Au vu des données publiées dans la littérature un schéma séquentiel par anthracyclines suivi de docétaxel nous a semblé être le plus favorable en terme d'efficacité pour les patientes. Le choix de l'anthracycline s'est porté sur la doxorubicine car d'une part son étude pharmacocinétique peut être menée avec un nombre limité de prélèvements sanguins par rapport aux autres anthracyclines utilisables dans cette situation comme l'épirubicine, et d'autre part le niveau de preuve de l'intérêt de l'étude du polymorphisme de MDR1 est supérieur pour la doxorubicine que pour l'épirubicine.

2.2.1.2. Evaluation de la réponse aux anthracyclines/taxanes

- L'évaluation de la réponse à la chimiothérapie a été réalisée sur les prélèvements postopératoire (pièce de tumorectomie ou mastectomie) de façon centralisée par le Dr Martine Antoine (Service d'anatomopathologie du Pr Patrice Callard, APHP Tenon). La réponse histologique complète a été évaluée selon les critères de Sataloff[263] et Chevallier [266].

La procédure d'inclusion en paraffine des prélèvements anatomo-pathologiques était la suivante :
- sur tumorectomie :

- si pas de lésion macroscopique : inclusion en paraffine en totalité de la pièce ;
- si lésion macroscopique : inclusion en paraffine de la lésion avec une douzaine de prélèvements (tranche horizontale et prélèvements perpendiculaires pour délimiter les plans superficiel et profond en regard du nodule tumoral) ;

- sur mastectomie : une douzaine de prélèvements sur la zone tumorale associés à deux prélèvements par quadrant et au centre et au niveau du mamelon ;
- curage ganglionnaire : inclusion en paraffine de la totalité des ganglions.

Par ailleurs la réponse clinique était également mesurée en tenant compte des données des examens cliniques et radiologiques. Ce bilan clinique et radiologique était réalisé à trois temps : avant et après chimiothérapie et à mi-parcours (après les anthracyclines et avant les taxanes).

L'examen radiologique comprenait une mammographie et une échographie mammaire, examens qui font partie du bilan habituel des patientes. Dans le cadre de cette étude, une imagerie par résonance magnétique (IRM) mammaire était également réalisée.

3.1.1.3. Génotypage du gène *MDR1*

La nature des variants alléliques du gène *MDR1* qui seront analysés tenait compte des données de la littérature concernant les polymorphismes de *MDR1* dans la population caucasienne. Ils ont été retenus selon deux critères :

- fréquence >10%
- situation dans des exons.

Au total, 5 polymorphismes, qui sont tous des SNP, remplissaient ces conditions. Ce sont les suivants (le chiffre figurant entre les nucléotides correspond à la position de ces nucléotides sur la séquence d'ADNc) :

- exon 2 : A 61 G
- exon 12 : C 1236 T
- exon 21 : G 2677 T/A
- exon 24 : G 2995 A
- exon 26 : C 3435 T

L'étude des polymorphismes du gène *MDR1* a été réalisée à partir de l'ADN des cellules mononucléées sanguines. Celles-ci étaient isolées par centrifugation du sang sur gradient de Ficoll puis conservées à -20°C jusqu'à l'analyse. Après extraction de l'ADN génomique

par phénol-chloroforme, le génotypage était réalisé en utilisant la technique suivante : amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel avec des amorces spécifiques, encadrant le polymorphisme à analyser. Pour un polymorphisme donné, la détermination du génotype était réalisée grâce à des sondes fluorescentes de type TaqMan (Applied Biosystem®), chaque sonde étant spécifique d'un variant allélique. Deux sondes étaient nécessaires dans tous les cas (polymorphisme biallélique) sauf dans le cas du polymorphisme de l'exon 21 pour lequel il fallait utiliser trois sondes (car polymorphisme triallélique).

Le génotypage du gène *MDR1* a été effectué par le Dr Anne Fajac dans le service d'Histologie-Biologie Tumorale de l'hôpital Tenon (Pr J.F. Bernaudin) en association avec l'Unité Fonctionnelle de Génétique Moléculaire du Pr F. Soubrier.

2.2.1.4. Pharmacocinétique des agents anti-cancéreux (doxorubicine et docétaxel)

L'étude pharmacocinétique a consisté à déterminer l'aire sous la courbe (*Area Under the Curve* ou AUC) pour la doxorubicine et le docétaxel. L'aire sous la courbe (exprimée en unités de concentration par le temps) représente la quantité de l'agent anti-cancéreux réellement mise à disposition de l'organisme : elle dépend en effet non seulement de la dose administrée mais aussi des phénomènes d'épuration. Elle permet donc d'évaluer l'imprégnation de l'organisme par l'agent anti-cancéreux étudié.

Des prélèvements sanguins étaient réalisés à différents temps afin d'effectuer le dosage plasmatique de la doxorubicine et du docétaxel. Les différents temps étaient conditionnés d'une part, par les propriétés pharmacologiques des anti-cancéreux étudiés, d'autre part, par les modalités d'administration de la chimiothérapie. De plus, pour certaines molécules un nombre minimal de prélèvements nécessaire à l'étude pharmacocinétique de ces molécules ont été définis, ce qui a permis de limiter le nombre de prélèvements à réaliser (*limited sampling strategy*). De telles données existent pour la doxorubicine[326] et le docétaxel[327].
Le temps de demi-vie terminale de la doxorubicine est de 30 heures et celui du docétaxel de 12 heures.

Les modalités de la chimiothérapie ont été les suivantes :
- 4 cures espacées de 3 semaines comprenant l'association :
    - de la doxorubicine (60 mg/m^2) par voie intra-veineuse pendant 15 minutes

- et du cyclophosphamide (600 mg/m^2) par voie intra-veineuse pendant 60 minutes puis 3 semaines plus tard :
- 4 cures espacées de 3 semaines comprenant du docétaxel (100 mg/m^2) par voie intra-veineuse pendant 60 minutes.

Compte tenu du protocole et des données de la littérature[326,327], nous avions établis comme nécessaires les prélèvements suivants :
- pour la doxorubicine : 1 prélèvement de 5 ml de sang aux temps 2 heures et 48 heures après le début de l'administration par voie intra-veineuse (soit 2 prélèvements au total).
- pour le docétaxel : 1 prélèvement de 5 ml de sang aux temps 5 minutes avant la fin de la perfusion, 20 minutes, 2 heures et 5 heures après la fin de la perfusion (soit 4 prélèvements au total).
L'étude pharmacocinétique ne portait que sur la première cure de chaque anti-cancéreux, le but étant de tester s'il existe un lien entre la pharmacocinétique de ces agents et le génotype.

Après centrifugation, le plasma était prélevé, congelé et stocké à -20°C jusqu'à l'analyse.
Le dosage de la doxorubicine et du docétaxel était effectué par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) avec, respectivement, détection fluorimétrique et ultraviolette.
Le profil pharmacocinétique des médicaments et le calcul des paramètres pharmacocinétiques étaient réalisés en utilisant le logiciel MicroPharm®.

Le dosage plasmatique des agents anti-cancéreux (doxorubicine et docétaxel) était effectué dans le service de Pharmacologie Clinique du centre anti-cancéreux René Huguenin, Saint-Cloud (Dr François Lokiec).

2.2.1.5. Nombre prévu de personnes-justification

Il était donc prévu d'inclure 140 patientes dans l'étude dont 110 seraient analysées.

Nous avions calculé le nombre nécessaire de patientes en nous centrant sur le polymorphisme du gène *MDR1* actuellement connu comme le plus pertinent, à savoir le polymorphisme C3435T. Trois types de génotypes existent : CC, TT et CT. D'après la littérature (15, 17), le génotype CC étant le plus péjoratif, nous souhaitions comparer le groupe CC au groupe (CT + TT).

Il s'agissait de comparer le pourcentage de patientes répondant à la chimiothérapie du groupe CC (pourcentage p1) à celui du groupe (CT + TT) (pourcentage p2).

Sachant que :
- l'on voulait mettre en évidence une différence d'au moins 30% entre les groupes CC et (CT+TT)
- 25% des sujets répondraient en moyenne à la chimiothérapie (réponse histologique) si on ne tenait pas compte du groupe, nous avions : p1 = 5% et p2 = 35%.

Pour un risque de première espèce a de 0,05 et une puissance 1-b de 0,8, les deux groupes CC et (CT+TT) étant en moyenne dans la proportion 20% et 80% respectivement dans la population caucasienne [208-210], le nombre N de patientes obtenu pour un test bilatéral était de103.

Ce nombre devait permettre également de mettre en évidence une différence d'au moins 40% dans la réponse clinique à la chimiothérapie entre les groupes CC et (CT+TT), sachant que nous attendions 60% de réponse en moyenne à la chimiothérapie si on ne tenait pas compte du groupe (a=0,05; 1-b=0,8, test bilatéral).

Ce nombre permettrait aussi de mettre en évidence une différence inférieure à 25% pour comparer les aires sous la courbe (AUC) des anti-cancéreux pour les mêmes groupes (a = 0,05; 1-b = 0,8; test bilatéral) sachant que l'écart type de l'AUC est de 30%.

2.2.1.6. Durée de participation de chaque personne ayant accepté de participer à la recherche et durée d'exclusion pour les recherches sans bénéfice individuel direct.

Le protocole établi était un protocole sans bénéfice individuel direct puisqu'il ne modifiait pas la stratégie thérapeutique des patientes incluses en fonction des résultats trouvés. De ce fait, chaque patiente participait à la recherche depuis le début de l'évaluation initiale carcinologique jusqu'à l'évaluation de la réponse histologique après anthracyclines et taxanes, soit pendant une période de 6 mois. La durée de la période d'exclusion était de 10 jours.

2.2.2. Schéma et conduite de la recherche

Le protocole de recherche est représenté sur la figure 9.

2.2.2.1. Critères de sélection des patientes

Etaient incluses des patientes atteintes de cancer du sein :

- ayant une tumeur mammaire supérieure à 2 cm et ne pouvant bénéficier d'emblée d'une chirurgie conservatrice,
- sans métastase à distance (en dehors d'une atteinte ganglionnaire locorégionale N1),
- d'origine caucasienne (la fréquence des polymorphismes du gène *MDR1* étant différente selon l'origine ethnique de la population étudiée)[209 211],
- recevant en situation néoadjuvante une chimiothérapie comprenant des anthracyclines (doxorubicine) et des taxanes (docétaxel) selon un schéma de type 4AC suivi de 4 docétaxel,
- ayant signé le formulaire d'information et de consentement éclairé et étant inscrites sur le fichier national.

Ne pouvaient être incluses des patientes ayant :

- une tumeur inférieure à 2 cm, pouvant donc bénéficier d'un traitement chirurgical d'emblée,
- la présence de métastases,
- une tumeur bifocale,
- un cancer cliniquement N2 ou N3,
- un cancer étant la récidive d'un cancer précédent,
- une contre-indication aux anthracyclines (car fraction d'éjection ventriculaire gauche inférieure à 50%),
- devant être traité avec un cardioprotecteur dexrazoxane (cardioprotecteur pouvant moduler l'expression de *MDR1*),
- une insuffisance rénale,
- une insuffisance hépato-cellulaire,
- une grossesse ou allaitement en cours,
- un défaut de prise en charge sociale (femme non affiliée à un régime de sécurité sociale ou à la CMU).

La chimiothérapie comprenant quatre cures de doxorubicine puis quatre cures de docétaxel, le protocole de recherche comprenait les six temps suivants au cours desquels étaient réalisés différents examens :

- avant la chimiothérapie
- pendant la première cure de doxorubicine
- après la fin des quatre cures de doxorubicine et avant la première cure de docétaxel
- pendant la première cure de docétaxel
- après la fin de la chimiothérapie et avant le traitement chirurgical
- traitement chirurgical permettant d'évaluer la réponse histologique.

2.2.2.2. Etape avant la chimiothérapie

Etaient réalisés le bilan carcinologique initial et un prélèvement sanguin pour effectuer le génotypage du gène *MDR1*.

Bilan carcinologique initial

Il comprenait l'examen clinique et les examens complémentaires suivants :

- biopsie mammaire
- mammographie
- échographie mammaire
- IRM mammaire

Le bilan réalisé afin d'éliminer une métastase comprenait au minimum : une radiographie thoracique, une scintigraphie osseuse et une échographie hépatique.

Génotypage

De façon concomitante était réalisé un prélèvement sanguin (50 ml) afin d'effectuer le génotypage du gène *MDR1*.

2.2.2.3. Pendant la première cure de doxorubicine : étude pharmacocinétique

Un prélèvement sanguin (5 ml) était réalisé aux temps 2 heures et 48 heures après le début de l'administration par voie intra-veineuse de la première cure de doxorubicine afin d'effectuer l'étude pharmacocinétique de cet agent anti-cancéreux.

2.2.2.4. Après la fin des quatre cures de doxorubicine

Après la fin des quatre cures de doxorubicine et avant de débuter le traitement par docétaxel, était réalisé un bilan carcinologique.

Bilan carcinologique

Il comprenait l'examen clinique et les examens complémentaires suivants :

- mammographie
- échographie mammaire
- IRM mammaire

2.2.2.5. Pendant la première cure de docétaxel : étude pharmacocinétique

Un prélèvement sanguin (5 ml) était réalisé aux temps 5 minutes avant la fin de la perfusion, 20 minutes, 2 heures et 5 heures après la fin de la perfusion afin d'effectuer l'étude pharmacocinétique du docétaxel.

2.2.2.6. Après la fin de la chimiothérapie et avant l'intervention chirurgicale

Etait réalisé de nouveau le même bilan carcinologique qu'après les 4 cures de doxorubicine.

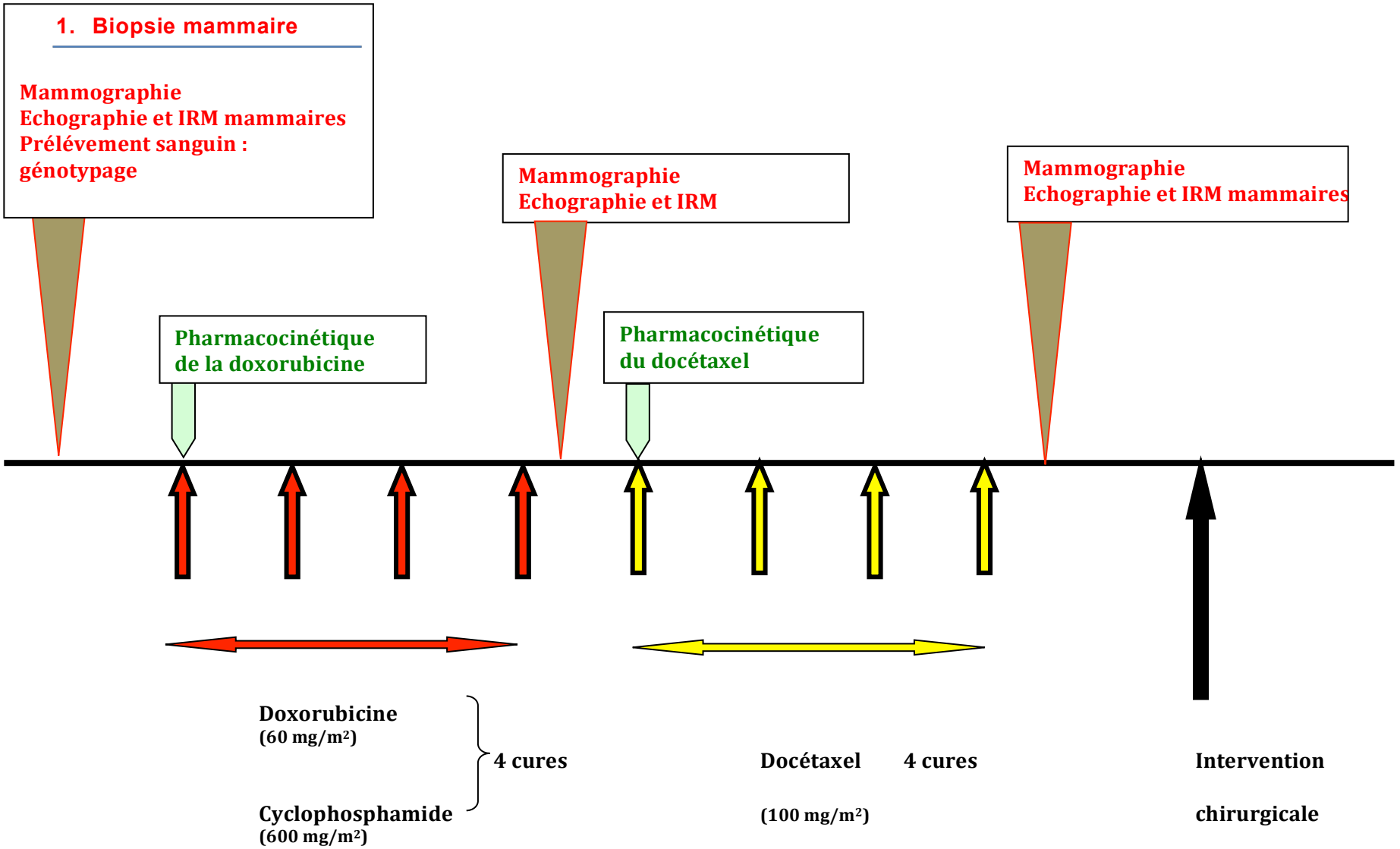
2.2.2.7. Etude anatomo-pathologique

Elle découle de l'intervention chirurgicale qui avait lieu après la fin de la chimiothérapie néoadjuvante.

L'étude centralisée anatomopathologique à consister à revoir:

- la microbiopsie initiale
- les prélèvements (tumorectomie/mastectomie/curage ganglionnaire) post-chimiothérapie.

Figure 9. Schéma général du protocole de recherche



2.2.2.8. Critères d'évaluation

L'indicateur principal était :

- la réponse histologique aux anthracyclines (doxorubicine) et aux taxanes (docétaxel) en fonction du type de polymorphisme du gène MDR1.

Les indicateurs secondaires étaient :

- la réponse clinique aux anthracyclines/taxanes en fonction du type de polymorphisme du gène MDR1,
- la pharmacocinétique des anthracyclines/taxanes en fonction du type de polymorphisme.

Les critères d'évaluation concernaient :

- les polymorphismes du gène MDR1,
- la réponse histologique,
- la réponse clinique,
- la pharmacocinétique des agents anti-cancéreux.

- Polymorphismes du gène MDR1

Pour un polymorphisme biallélique ab donné, il existe 3 variants alléliques :

- homozygote aa,
- homozygote bb,
- hétérozygote ab,

Les patientes étaient donc classées, pour un polymorphisme donné, en trois groupes (aa, bb, ab).

Tableau 10. Caractéristiques des polymorphismes exoniques étudiés (homozygoties et hétérozygoties)

	exon 2 (61)	exon 12 (1236)	exon 21 (2677)	exon 24 (2995)	exon 26 (3435)
homozygote aa	AA	CC	GG	GG	CC
homozygote bb	GG	TT	TT	AA	TT
hétérozygote ab	AG	CT	GT ou AT	AG	CT

- Réponse histologique

La réponse histologique était définie selon les classifications de Sataloff[263] et Chevallier [266].

Les patientes étaient classées en deux groupes : réponse histologique complète/absence de réponse histologique complète (répondeuses/non répondeuses). Le pourcentage attendu de réponse histologique complète était de 25%.

- Réponse clinique

La réponse clinique aux anthracyclines/taxanes était mesurée sur la base de la taille de la tumeur avant chimiothérapie et après chimiothérapie comprenant la doxorubicine puis le docétaxel. La mesure de la taille tumorale après chimiothérapie était réalisée à deux temps :

- après les quatre cures de doxorubine,
- après les quatre cures de docétaxel et avant l'intervention chirurgicale.

La mesure de la taille tumorale était effectuée en intégrant les données de l'examen clinique (palpation) et de l'examen radiologique de la tumeur. Il s'agissait donc d'une réponse clinique au sens large du terme puisqu'elle prend en compte non seulement les données de l'examen clinique à proprement parler mais aussi celles de l'examen radiologique.

En fonction de l'évolution de la taille de la tumeur après chimiothérapie, les patientes étaient classées en deux groupes : répondeuses et non répondeuses.
Le type de réponse clinique, non propre au cancer du sein, était défini ainsi selon les critères suivants:
- réponse complète si la tumeur a disparu,
- réponse partielle si la diminution de la taille tumorale est strictement supérieure à 50% de la taille initiale,
- stabilité si la diminution de la taille tumorale est inférieure ou égale à 50% ou si l'augmentation de la taille tumorale est inférieure ou égale à 25% de la taille initiale,
- progression si l'augmentation de la taille tumorale est strictement supérieure à 25% de la taille initiale.

Les patientes pour lesquelles la réponse était complète ou partielle étaient considérées comme répondeuses, celles pour lesquelles il était constaté une stabilité ou une progression étaient considérées comme non répondeuses.
Le taux de réponse attendu avec ce protocole de chimiothérapie associant anthracyclines puis taxanes était de 60%. Le pourcentage attendu de patientes présentant une stabilité était de 30% et le pourcentage attendu de patientes présentant une progression est de 10%.

- Pharmacocinétique des anthracyclines/taxanes

L'aire sous la courbe (AUC) a servi de critère d'évaluation de la pharmacocinétique des anti-cancéreux.
Des valeurs moyennes (avec un écart type de 30%) d'aires sous la courbe pour la doxorubicine et le docétaxel ont été préalablement définies dans le laboratoire de Pharmacologie (Centre René Huguenin, Dr François Lokiec) où étaient réalisés les dosages des anti-cancéreux.

2.2.2.9. Gestion des données statistiques

- Stratégie d'analyse des données

Nous avons analysé s'il existait un lien entre certains polymorphismes du gène MDR1 et :

- la réponse histologique aux agents anti-cancéreux doxorubicine/docétaxel,
- la réponse clinique à ces mêmes agents,
- la pharmacocinétique de ces mêmes agents.

Nous avons centré l'analyse sur le polymorphisme du gène MDR1 actuellement connu comme le plus pertinent, à savoir le polymorphisme C3435T. Cependant, les autres polymorphismes étaient analysés de la même façon.

Pour le polymorphisme C3435T, trois groupes de patientes étaient définis CC, TT et CT. Compte tenu des données de la littérature, ces trois groupes ont été regroupés en deux groupes : CC d'une part et (TT+CT) d'autre part.

- Réponse histologique aux agents anti-cancéreux

Selon notre hypothèse, les deux groupes de patientes CC, (TT+CT) devaient répondre différemment aux agents anti-cancéreux. Deux types de réponse histologique étaient possibles : réponse histologique complète ou absence de réponse histologique complète. Ce qui conduisait à un tableau de contingence de type 2x2 :

	Réponse à la chimio	Pas de réponse à la chimio
CC	A	C
CT+TT	C	D

Effectif de l'étude A+B+C+D

- Réponse clinique aux agents anti-cancéreux

En ce qui concerne la réponse clinique, quatre types de réponse clinique étaient possibles : réponse complète, réponse partielle, stabilité ou progression. En fait, d'un point de vue clinique, deux alternatives sont importantes : les patientes répondent (réponses complète et partielle) ou ne répondent pas (stabilité et progression) à la chimiothérapie. C'est pourquoi nous avons regroupé les patientes en deux groupes : patientes répondant / ne répondant pas à la chimiothérapie. Un tableau de contingence du même type que ci-dessus fut établi.

- Pharmacocinétique des agents anti-cancéreux

En ce qui concerne l'analyse des données pharmacocinétiques en fonction des polymorphismes de MDR1, les aires sous la courbe ont été comparées dans les 2 groupes CC et (TT+CT).

- <u>Justification des tests statistiques</u>

Pour les trois types d'analyse ci-dessous, nous nous sommes placés dans le cas bilatéral car on ne pouvait en l'absence de données préalables présager de la réponse supérieure d'un groupe ou l'autre de patientes.

- Réponse histologique et réponse clinique aux agents anti-cancéreux

Pour l'analyse de la réponse histologique ou de la réponse clinique en fonction du polymorphisme de MDR1, le test statistique à utiliser est le test de $\chi 2$ si les effectifs théoriques sont supérieurs à 5 ou le test exact de Fischer si cela n'est pas le cas.

- Pharmacocinétique des agents anti-cancéreux

Pour l'analyse de la pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel en fonction du polymorphisme de MDR1, il fallait comparer les aires sous la courbe des

agents anti-cancéreux au moyen d'un test z. Cette approche avait l'avantage de prendre en compte simultanément le facteur concentration et le facteur temps.

- Analyse des données et logiciels de travail

La saisie des données a été effectuée à l'aide du logiciel Excel et la base de donnée a été déclarée par la CNIL.
L'analyse statistique des données a été réalisée par l'unité de Biostatistiques et Informatique Médicale de l'hôpital Tenon; INSERM U444 (Dr Pierre Levy) au moyen du logiciel JMP®.

2.3. Description de la population de l'étude

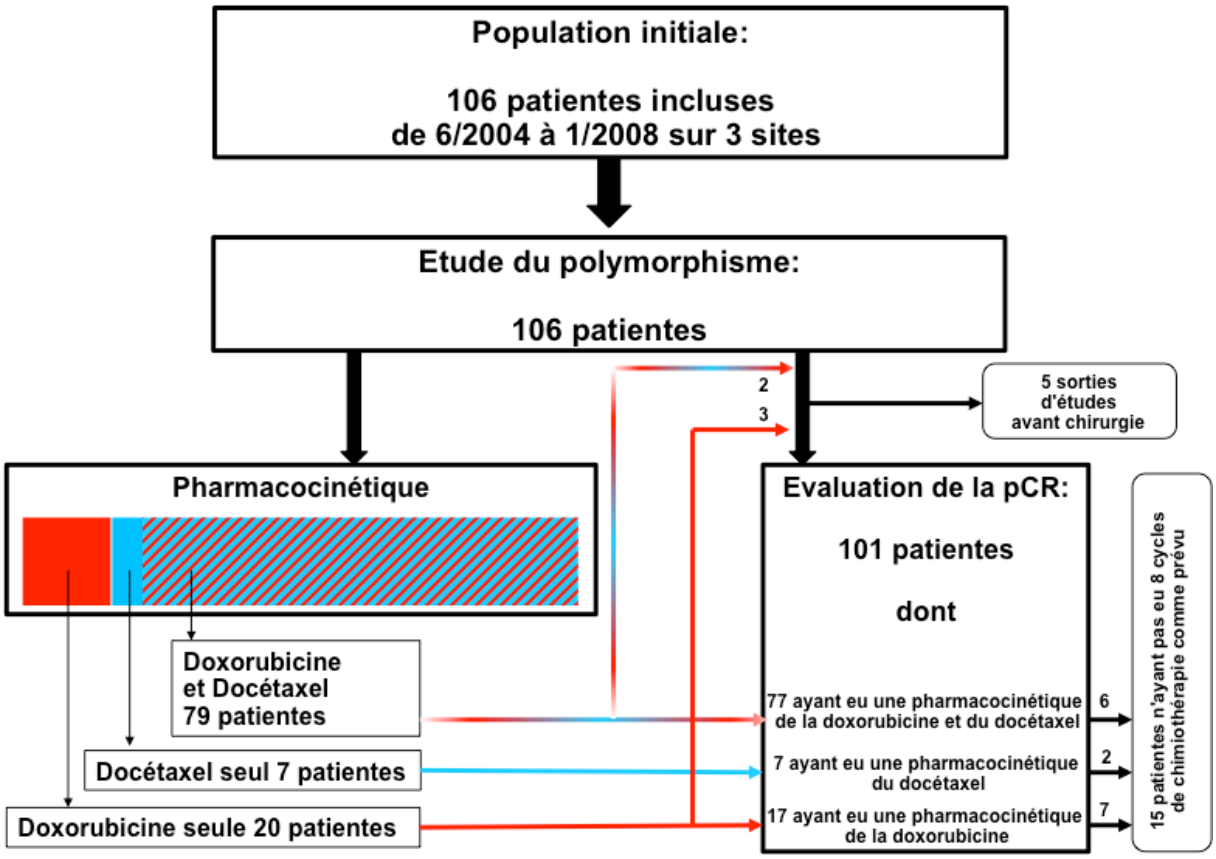
De juin 2004 à janvier 2008, 106 patientes ont été incluses entre l'hôpital Tenon (Paris), l'hôpital Européen Georges Pompidou (Paris) et l'hôpital Avicenne (Bobigny).
Toutes ces patientes ont eu un prélèvement initial permettant l'étude des polymorphismes prévus.
5 patientes ont étés exclues de l'analyse initiale en ce qui concerne le taux de pCR (sorties d'étude avant la chirurgie)
17 patientes n'ont pas eu la totalité des 8 cycles de chimiothérapie prévue (pour inneficacité du traitement ou toxicité)
Toutes les patientes ont eu une étude de la pharmacocinétique mais seules 79 patientes ont des données sur la pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel, 7 patientes ont des données de pharmacocinétique du docétaxel seul et 20 patientes de la doxorubicine seule.
Au total sur 101 patientes évaluables pour la pCR et ayant toutes eu une étude des polymorphismes prévus on note que:

- 71 patientes ont eu les 8 cycles de chimiothérapie et une étude de la pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel
- 5 patientes ont eu les 8 cycles de chimiothérapie et une étude de la pharmacocinétique du docétaxel seul
- 10 patientes ont eu les 8 cycles de chimiothérapie et une étude de la pharmacocinétique de la doxorubicine seule

- 6 patientes n'ont pas eu les 8 cycles de chimiothérapie mais ont tout de même eu une étude de la pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel
- 2 patientes n'ont pas eu les 8 cycles de chimiothérapie mais ont tout de même eu une étude de la pharmacocinétique du docétaxel seul
- 7 patientes n'ont pas eu les 8 cycles de chimiothérapie mais ont tout de même eu une étude de la pharmacocinétique de la doxorubicine seule

Ces données sont présentées sur la figure 9

Figure 10 : « Flow chart » de l'étude



Les caractéristiques générales de la population étudiée sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11. Caractéristiques des patientes dans l'étude (n=106)

	Moyenne (extrêmes) où n
Age au diagnostique (années)	**48 (26-76)**
Groupe ethnique	
Caucase	**76**
Afrique du nord et sub-saharienne	**28**
Asie	**2**
Statut « ménopausée » à l'inclusion	
Non	**65**
Oui	**41**
Type histologique invasif (biopsie initiale)	
Canalaire	**92**
Lobulaire	**12**
Mixe	**1**
Autre	**1**
Grade tumoral (biopsie initiale)	
I	**9**
II	**34**
III	**61**
Non évaluable	**2**
Statut Récepteurs estrogènes (RO)	
Positif (≥10% IHC)	**66**
Négatif	**36**
Non évalué	**4**
Statut Récepteurs Progestérone (RP)	
Positif (≥10% IHC)	**52**
Négatif	**49**
Données manquantes	**5**
Statut HER2 (IHC en nombre de +)	
0	**60**
1	**19**
2	**4**
3	**19**
Non évaluable	**4**
Triple négative	
Oui	**23**
Non	**81**
Données manquantes (statut HER2)	**2**
Taille tumorale initiale (clinique et radio)	
T1	**0**
T2	**49**
T3	**43**
T4	**14**

2.4. Résultats concernant le taux de réponse complète histologique

Les résultats de l'évaluation centralisée du taux de pCR sont reportés dans le tableau 12.

Tableau 12. Réponse après chimiothérapie néoadjuvante selon la classification de Sataloff[263] (n=101)

	T-A	T-B	T-C	T-D	
N-A	5	1	0	2	8
N-B	11	9	17	4	41
N-C	6	10	16	1	33
N-D	0	1	6	12	19
	22	21	39	19	101

On note donc un taux de pCR (T-A/N-A ou T-A/N-B) de 16% environ dans la population générale.

Les cancers ont été classes en fonction de leur sous-type moléculaire également. Cette classification repose sur une approche en Immunohistochimie (IHC) selon les recommandations de la conférence de consensus de St-Gallen[328] avec :

- les cancers HER2 positifs définis par l'hyper expression du récepteur HER2 (+++ en IHC ou amplifié en technique d'hybridation in situ)
- les cancers luminaux par la positivité des récepteurs aux estrogènes en IHC avec une prolifération basse (Ki67 < 15%) définissant les tumeurs « luminales A » et une prolifération élevée (Ki67 ≥ 15%) définissant les tumeurs « luminales B ».
- les cancers triple négatifs (non HER2 et « non luminales ») définis par des récepteurs aux estrogènes à la progestérone et HER2 négatifs

Les résultats du taux de pCR en fonction du sous-type moléculaire sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13. Evolution de la biologie tumorale après traitement néoadjuvant en function du sous-type moléculaire. (n=101)

Sous-type moléculaire avant traitement néoadjuvant	Sous-type moléculaire après traitement néoadjuvant					
	Luminal A	Luminal B	HER2 positives	Triples négatives	pCR=absence de résidu tumoral	
Luminal A	14	0	0	0	0	14
Luminal B	23	16	0	0	6	45
HER2 positives	2	0	13	0	4	19
Triples négatives	0	0	0	17	6	23
	39	16	13	17	16	101

On constate que si le taux de pCR a été de 16% dans la population générale traitée, il était de 0% pour les « luminales A », de 13% pour les « luminales B », de 21% pour les HER2 positives (a noté que sur les 5 patientes ayant eu du trastuzumab en situation néoadjuvante 3 ont eu une pCR) et de 26% pour les « triple négatives ».

Par ailleurs il existait un « down staging » moléculaires pour les cancers « luminaux B » puisque sur 45 patientes porteuses d'un cancer initial de ce type seul 16 patientes ont une tumeur « luminale B » demeurant « luminale B » après chimiothérapie néoadjuvante et 29 patientes ont eu soit une réponse histologique complète (6 patientes) soit une tumeur dont le résidu tumoral avait les caractéristiques d'un cancer luminal A (23 patientes soit 51%).
On note également que chez deux patientes ayant un cancer initialement HER2 positif nous n'avons pas retrouvé au sein du résidu tumoral résiduel actif d'expression de HER2. L'un était positif pour les récepteurs hormonaux initialement avec un indice de prolifération élevée et l'autre était négatif mais de caractère clinique inflammatoire. Aucune de ces tumeurs n'avait été exposé au trastuzumab en situation néoadjuvante.

2.5. Résultats concernant l'étude des polymorphismes d'ABCB1

L'étude des 5 premiers polymorphismes prévus a permis d'établir que nous ne retrouvions pas dans notre population de polymorphisme sur l'exon 24 en position G2995A (résultats non présentés), raison pour laquelle et au vue d'une publication portant sur d'autres polymorphismes potentiellement candidats nous avons étudiés le polymorphisme dans la région promotrice du gène ABCB1 en T-129C et un polymorphisme ABCG2 situé au niveau de l'exon 5 C421A[104] (tableau 14).

Tableau 14. Fréquence génotypique de certains polymorphismes d'ABCB1 et d'ABCG2 dans la population étudiée (n=106) et fréquence allélique.

Polymorphisme		Fréquence génotypique			Fréquence allélique	
ABCB1						
rs9282564	A61G	AA	GG	AG	A	G
exon 2		0.90	0.00	0.10	0.95	0.05
rs1128503	C1236T	CC	TT	CT	C	T
exon 12		0.42	0.14	0.44	0.64	0.36
rs2032582	G2677W	GG	WW	GW	G	W
exon 21		0.49	0.11	0.40	0.69	0.31
rs1045642	C3435T	CC	TT	CT	C	T
exon 26		0.39	0.14	0.47	0.625	0.375
rs3213619	T-129C	TT	TC	CC	T	C
promoteur		0.88	0.11	0.01	0.935	0.065
ABCG2						
rs2231142	C421A	CC	CA	AA	C	A
exon 5		0.82	0.17	0.01	0.905	0.095

2.6. Présentations d'articles

2.6.1. Mise au point sur la pharmacologie des taxanes (article 1)

Un travail préparatoire au moment de la rédaction du protocole a été la réalisation d'une mise au point sur la pharmacologie des taxanes.

The Oncologist®

This material is protected by U.S. Copyright law.
Unauthorized reproduction is prohibited.
For reprints contact: Reprints@AlphaMedPress.com

Preclinical Pharmacology of the Taxanes: Implications of the Differences

JOSEPH GLIGOROV, JEAN PIERRE LOTZ

CancerEst, APHP Tenon, Medical Oncology, Paris, France

Key Words. *Taxane · Docetaxel · Paclitaxel · Pharmacology · Pharmacokinetics*

LEARNING OBJECTIVES

After completing this course, the reader will be able to:

1. Identify the differences in molecular pharmacology of the taxanes.
2. Describe the impact of the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of the taxanes on their administration and toxicity.
3. Outline the toxicity profiles of paclitaxel and docetaxel.

CME Access and take the CME test online and receive 1 hour of AMA PRA category 1 credit at CME.TheOncologist.com

ABSTRACT

Taxanes are one of the most powerful classes of compounds among all chemotherapeutic drugs. Only 30 years separate the isolation of the first taxane from the results of direct clinical comparisons in metastatic breast, ovarian, and lung cancer between the two taxanes available in routine clinical practice. These results suggest a more favorable benefit-to-risk ratio for docetaxel compared to paclitaxel when these drugs are used as single agents or in combination with other chemotherapeutic agents in an every-3-week dosing regimen. Pharmacological data support the difference between the taxanes, likely explaining the clinical results. Considering the molecular pharmacology of the two drugs, docetaxel appears to bind to ®-tubulin with greater affinity and has a wider cell cycle activity than paclitaxel. Docetaxel also appears to have direct antitumoral activity via an apoptotic effect mediated by bcl-2 phosphorylation. In addition, docetaxel has a longer retention time in tumor cells than paclitaxel because of greater uptake and slower efflux. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the taxanes show both agents to be extensively metabolized in the liver, and paclitaxel has a nonlinear pharmacokinetic behavior while docetaxel has linear pharmacokinetics. These differences explain the more simple treatment schedule and favorable results for docetaxel as a single agent and in combination therapy. Last, but not least, there is a pharmacokinetic interaction between paclitaxel and the anthracyclines, an active class of compounds commonly used in the treatment of breast cancer. This pharmacokinetic interaction is associated with greater cardio- and myelotoxicities, which are sequence dependent. These pharmacological data likely explain the different clinical development strategies for the two molecules as well as the different clinical results from individual trials and direct comparisons. *The Oncologist* 2004;9(suppl 2):3-8

INTRODUCTION

Among new chemotherapeutic agents, the taxanes have emerged as one of the most powerful classes of compounds, exhibiting a wide range of activity. Randomized clinical trials evaluating docetaxel and paclitaxel in the first-line treatment setting for metastatic breast, lung, ovarian, and

Correspondence: Joseph Gligorov, M.D., CancerEst, APHP Tenon, Medical Oncology, 4 rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France. Telephone: 33-156-016024; Fax: 33-156-016452; e-mail: joseph.gligorov@tnn.ap-hop-paris.fr
Received February 27, 2004; accepted for publication April 5, 2004. ©AlphaMed Press 1083-7159/2004/$12.00/0

digestive cancers, as well as in the adjuvant setting for breast cancer, have confirmed that taxanes are leading contributors in the armamentarium of cancer treatments.

Paclitaxel was isolated in 1971 from the Pacific yew (*Taxus brevifolia*), and docetaxel, a semi-synthetic taxane analogue from the European yew (*Taxus baccata*), was identified in the 1980s. Though the taxanes share similar mechanisms of action, differences are apparent in their molecular pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamic profiles. Indeed, these differences may account for the differences observed between the taxanes in their clinical activity and toxicity.

Molecular Pharmacology

Tubulin is the "building block" of microtubules, and agents that bind tubulin are believed to block cell division by interfering with the function of the mitotic spindle, blocking the cells at the metaphase-anaphase junction of mitosis. Microtubules are complex structures involved in numerous cellular functions, including the maintenance of cell shape, intracellular transport, secretion, and neurotransmission. Moreover, microtubules are highly dynamic and unstable structures that are constantly incorporating free dimers and releasing dimers into the soluble tubulin pool. Taxane antitumor activity is the result of the binding of drug to the beta subunits of tubulin, which causes the stabilization of tubulin polymerization. This stabilization results in cell cycle arrest at the G_2/M phase, thus inhibiting mitosis [1]. Docetaxel and paclitaxel are different in their molecular pharmacology, potentially explaining their different activity and toxicity profiles (Table 1). Docetaxel exhibits greater affinity to ®-tubulin, targeting centrosome organization and acting on cells in three phases of the cell cycle (S/G_2/M), whereas paclitaxel causes cell damage by affecting the mitotic spindle in the G_2 and M phases of the cell cycle [2]. Docetaxel was proven to be almost totally lethal against S-phase cells, while the maximum resistance to paclitaxel is early in the S phase [3]. The *bcl-2* gene encodes the oncoprotein that prevents apoptosis, and this gene is overexpressed in several solid tumors, including breast, lung, prostate, and nasopharyngeal cancers. Docetaxel induces Bcl-2 phosphorylation and apoptotic cell death at concentrations 100-fold less than those required by paclitaxel [2]. Presently, the best described mechanism of resistance to antitubulin agents is the multidrug resistant (MDR) phenotype, which is mediated by Pgp, the 170-kD ATP-binding transport protein encoded by the *MDR1* gene [1]. Additional differences between the taxanes include greater uptake of docetaxel into tumor cells and slower efflux of docetaxel from tumor cells, thus leading to longer retention times, providing a possible explanation for the incomplete cross-resistance between the drugs [4]. In vitro, the antiproliferative actions of docetaxel and paclitaxel were studied against a variety of freshly explanted human tumor specimens, including breast, lung, ovarian, and colorectal cancers. At concentrations of 10 mg/ml, 41% of docetaxel-treated specimens achieved significant inhibition, compared with 33% of paclitaxel-treated specimens, demonstrating high cytotoxicity with docetaxel as well as incomplete cross-resistance between the taxanes [5].

The incomplete cross-resistance between the taxanes found preclinically, specifically the activity of docetaxel in paclitaxel-resistant disease, has been confirmed in several tumor types, specifically, breast, ovarian, and lung cancers (Table 2) [6-8]. *Valero* and colleagues [6] evaluated the efficacy and safety of docetaxel in breast cancer patients who had previously received at least two chemotherapy regimens for metastatic disease and were progressing during paclitaxel therapy. The objective response rates observed were not significantly different when stratified by previously received paclitaxel dose. Interestingly, there were no responses observed in 12 patients who had received paclitaxel by a continuous 24-hour infusion; however, the response rate in 32 patients who received paclitaxel by either a 1-hour or 3-hour

Table 1. Mechanistic differences between docetaxel and paclitaxel

Property	Docetaxel	Paclitaxel	Comment
High-affinity ®-tubulin binding	1.9	1.0	Higher intracellular drug concentrations are associated with higher log cell kills and inhibition of tumor growth.
Drug concentration causing maximum polymerization	0.2 µM	0.4 µM	Docetaxel is twice as potent as paclitaxel in inhibiting microtubule depolymerization.
Microtubule target	Centrosome organization	Mitotic spindle	Docetaxel affects centrosome organization in the S phase, resulting in incomplete mitosis and cell death; it is only partially toxic against cells in mitosis and has minimal toxicity against cells in G_1, leading to an accumulation of cells in the G_2/M phase; this differs from paclitaxel, which causes cell damage by affecting the mitotic spindle.
Cell cycle specificity (phase)	S, G_2, M	G_2, M	

Table 2. Efficacy of docetaxel in paclitaxel-resistant disease*

Study	Paclitaxel-resistant disease	*n* of patients	Docetaxel (mg/m$_2$ every 3 weeks)	Overall response rate (%)	Median survival (months)
Valero et al. [6]	Breast	46	100	18	10.5
Verschraegen et al. [7]	Ovarian	30	100, 75	23	9.5
Fossella et al. [8]	NSCLC	250	100, 75	10.8, 6.7	5.5, 5.7

*Paclitaxel-resistant disease was defined in these studies as disease progression after paclitaxel treatment.

infusion was 25%. A second phase II trial evaluated two dose levels of docetaxel in patients with paclitaxel-resistant Müllerian carcinoma [7]. Resistance to paclitaxel was defined as disease progression during treatment, failure to achieve tumor regression after a minimum of four courses of therapy, or recurrence of disease within 6 months of completion of paclitaxel therapy. Of the 19 patients that progressed while receiving paclitaxel, 11% responded to docetaxel, while 45% of those in other paclitaxel-resistant categories responded to docetaxel. The docetaxel responders had a median taxane-free interval of 73 weeks while nonresponders had a taxane-free interval of only 19 weeks, indicating that docetaxel is active in paclitaxel-resistant Müllerian carcinoma, especially in those patients with long taxane-free intervals.

The results of a phase III trial reported by *Fossella* and colleagues [8] that compared two dose levels of docetaxel with standard non-small cell lung cancer (NSCLC) treatments further demonstrate the incomplete cross-resistance exhibited with taxane therapy. Of the 250 patients randomized to treatment with docetaxel, 73% had received prior paclitaxel therapy. A subset analysis of this group determined that the likelihood of response to docetaxel was not impacted by previous treatment with paclitaxel because the partial response rates were similar for those with prior exposure (20%) and those without prior exposure (15%) [8].

As previously stated, taxanes arrest cells in the G$_2$/M phase of mitosis, which is also the phase of the cell cycle that is most radiosensitive. Preclinical data evaluating the ability of docetaxel to enhance tumor response and influence radiation injury to normal tissues have shown that, if docetaxel is administered within 2 days before radiation therapy, it results in greater therapeutic gains from radiation [9, 10]. Mice were treated with 33 mg/kg of docetaxel with or without 9-21 Gy of radiation, with delay of tumor growth being the primary end point [9]. To determine the effect on normal tissue, jejunal cells were evaluated. Docetaxel enhanced tumor radioresponse by a factor of 2.33 when administered 48 hours prior to radiation; it only slightly enhanced radiation-induced damage to the jejunal cells and only when given 3-9 hours before radiation. A second murine trial using the same dose of docetaxel with or without 5-65 Gy of radiation also resulted in delayed tumor growth and enhanced response to radiation [11]. Furthermore, docetaxel induced infiltration of the tumor with lymphocytes; percentages were <2% in the control and 27% with docetaxel [11]. This was secondary to the influx of helper T cells and natural killer cells, indicating that docetaxel also possesses immunomodulating properties. The radiosensitizing effects of docetaxel relative to paclitaxel were evaluated in an in vitro comparative analysis using three human cancer cell lines (cervical cancer, mesothelioma, and lung cancer) [12]. Results showed that all three cell lines were more sensitive to docetaxel than to paclitaxel and that, although mesothelioma cells were intrinsically resistant to both radiation and taxanes, the resistance was partially overcome with administration of docetaxel before radiation. These preclinical data suggest that docetaxel is a potent radiosensitizer [9-12].

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics

There are substantial differences in the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of docetaxel and paclitaxel, an issue which may contribute to the difficulties in defining the optimal delivery schedule for paclitaxel monotherapy and combination regimens, particularly with anthracyclines. Both taxanes are extensively metabolized in the liver by the cytochrome P-450 enzymes and undergo biliary excretion as their main route of elimination, thus resulting in the need for dose reductions in patients with elevated liver enzymes. A major fraction of the taxane dose is excreted in feces as parent drug or hydroxylated metabolites; the known metabolites of both taxanes are either inactive or less potent than the parent compounds. Both agents have wide tissue distribution, are highly protein bound, and approximately 6% of either drug is renally eliminated.

Studies in mice and humans have determined that paclitaxel exhibits nonlinear pharmacokinetics, a characteristic further compounded by the addition of Cremophor EL, a vehicle in the formulation to improve its water solubility [13]. Pharmacokinetic modeling of paclitaxel indicates that

saturable distribution and elimination processes potentially explain its nonlinear pharmacokinetic behavior [14]. Clinical implications of nonlinear pharmacokinetics emerge as dose escalations or reductions of paclitaxel result in disproportionate increases or decreases in both the area under the time-concentration curve (AUC) and the peak plasma concentration (C_{max}). In 30 ovarian and breast cancer patients receiving paclitaxel by 3- and 24-hour infusions, *Gianni* and colleagues [15] observed that neutropenia was not related to the AUC of paclitaxel or its metabolite, 6 alpha-hydroxypaclitaxel, or to C_{max}, but was significantly correlated with the duration that the paclitaxel plasma concentration was ≥0.05 μM. Thus, shorter infusions should be associated with fewer adverse clinical outcomes.

Conversely, docetaxel exhibits linear pharmacokinetics and is customarily administered over 1 hour, thus, any dose adjustments result in proportional modifications in the AUC and C_{max}. Population pharmacokinetic studies have confirmed that clearance of docetaxel is significantly lower with increasing age, less body surface area, and higher liver function values [16]. Moreover, in patients with advanced cancer, the first-course docetaxel AUC is a significant predictor of hematologic toxicity ($p < 0.001$) [17]. It has been suggested that low-dose, weekly administration of docetaxel may potentially be better tolerated than the every-3-week schedule, thereby enabling the treatment of elderly and poor performance status patients—populations who generally have decreased drug clearance and, subsequently, more toxicity. A phase II study of 29 women with metastatic breast cancer receiving 40 mg/m^2 weekly of docetaxel supports the concept that this administration tactic is effective, with a superior toxicity profile compared with every 3-week dosing [18]. Each cycle of therapy consisted of weekly docetaxel for 6 weeks followed by a 2-week rest period; treatment was continued until disease progression or removal from the study (due to either toxicity or patient preference). The median patient age was 57 years, and all patients but one had Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status scores of 0 or 1. The overall response rate was 41%, and therapy was well tolerated, with no reports of grade 4 toxicity (only 28% of patients exhibited grade 3 toxicity). The most frequently reported grade 3 toxicities with the weekly regimen were myelosuppression (14%) and fatigue/asthenia (14%), which differs from the typical toxicities of neutropenia, sensory neuropathy, and nail changes associated with the every-3-week administration schedule.

Slaviero and colleagues [19] recently reported study results evaluating the relationship between clearance and toxicity of a weekly docetaxel regimen in patients with advanced cancer. Fifty-four patients (median age of 63 years) with a median ECOG performance status of 1 were treated with docetaxel at a dose of 40 mg/m^2 weekly. The relationships among docetaxel clearance, patient characteristics (e.g., age, liver enzymes), and toxicities were estimated using linear regression and nonparametric statistics. Acute grade 3/4 toxicity after the first dose of therapy was found to be associated with decreased docetaxel clearance ($p = 0.004$) but was not associated with age or performance status ($p > 0.05$). It was determined, however, that mean docetaxel clearance was significantly correlated with liver function values, suggesting that reduced hepatic drug clearance clearly plays a role in predicting which patients will experience acute toxicity on a weekly schedule.

Drug Interactions

The majority of drug interactions associated with the taxanes have primarily involved paclitaxel, the most significant being between paclitaxel and the anthracyclines. Paclitaxel-doxorubicin combinations have proven to be highly effective in patients with breast cancer, with response rates ranging from 58%-94% [20-22]. However, because of the associated cardiac toxicity with this combination, issues regarding the optimal schedule and sequence of administration remain in question. Clinically, it appears that this interaction is schedule dependent. *Gianni* and colleagues [23] conducted a trial evaluating paclitaxel (as a 3-hour infusion) plus doxorubicin (as a 15-minute bolus infusion) in 36 women with chemotherapy-naïve metastatic breast cancer. The objectives of that study were to assess the role of administration sequence, the time interval between drugs, and the duration of doxorubicin infusion on both paclitaxel and anthracycline disposition. The effect of paclitaxel on increasing doxorubicin-associated cardiotoxicity appeared greater when the paclitaxel was administered prior to the doxorubicin, if the interval between drug administrations was <1 hour, and if the paclitaxel infusion was <3 hours. Conversely, cardiotoxicity was less when doxorubicin administration preceded paclitaxel.

Because of the cardiotoxicity observed with the doxorubicin-paclitaxel combination and the fact that epirubicin is also an anthracycline that is classically associated with less cardiotoxicity, the combination of epirubicin-paclitaxel is logical. Therefore, the sequence effect of epirubicin and paclitaxel was studied in 39 patients with stage II breast cancer [24]. Patients received bolus epirubicin followed by a 3-hour paclitaxel (ET) infusion or the opposite sequence (TE) every 3 weeks for four cycles. Clinically, there was no significant difference in nonhematologic toxicities. However, a sequence-dependent effect on the myelotoxicity profile was observed, as evidenced by lower neutrophil and platelet nadirs and a significantly slower neutrophil

recovery in the TE group. Furthermore, when paclitaxel preceded epirubicin, the AUC of epirubicin was increased by 37% (2,346 ± 1,162 ng/ml/hour versus 1,717 ± 542 ng/ml/hour; $p = 0.002$) and the total clearance was decreased, on average, by 25%. Overall, these findings confirm that there is a sequence-dependent pharmacokinetic interaction between paclitaxel and epirubicin, and clinical toxicity is minimized by maintaining the classic administration schedule of epirubicin followed by paclitaxel.

Docetaxel-anthracycline combinations have resulted in no clinically significant effect on the anthracycline pharmacokinetics. In a trial of breast cancer patients, epirubicin (90 mg/m$_2$ i.v. bolus) was immediately followed either by docetaxel (70 mg/m$_2$ as a 1-hour infusion) or paclitaxel (175 mg/m$_2$ over 3 hours). While no change in the pharmacokinetic profile of epirubicin was observed when followed by either paclitaxel or docetaxel, there were clear differences between the effects that each taxane had on the epirubicin metabolites. Statistically significant increases in C_{max} (78.5 ng/ml versus 61.9 ng/ml, $p < 0.05$) and AUC (1,521 ng/ml/hour versus 848 ng/ml/hour, $p < 0.01$) of epirubicinol (EOL) were observed when epirubicin was followed by paclitaxel but not when it was followed by docetaxel [25]. These data indicate that there is no apparent pharmacokinetic interaction between the taxanes and the parent compound, epirubicin, whereas the epirubicin metabolite EOL is clearly more affected by paclitaxel than docetaxel. Whether these effects on the epirubicin metabolites have any relevance to toxicity and efficacy remains to be determined.

Toxicities of the Taxanes

The differences in the taxanes are also apparent in their adverse effect profiles. Paclitaxel is associated with anaphylaxis and severe hypersensitivity reactions characterized by hypotension, dyspnea, angioedema, and generalized urticaria, likely attributable to the Cremophor EL solubilizer. Other reactions typically more related to paclitaxel than docetaxel include myalgias and neuropathy. The side-effect profile of docetaxel appears to be schedule dependent. When administered every 3 weeks, docetaxel is more frequently associated with reversible, noncumulative neutropenia, fluid retention, cutaneous reactions, and hyperlacrimation (Table 3). However, when administered via a weekly dosing schedule, the toxicity profile of docetaxel is different and includes fewer hematologic toxicities, less stomatitis, fewer cutaneous events, and fewer neurologic toxicities, but a greater amount of grade 3/4 fatigue/asthenia [18]. Side effects common to both methods of administration include hyperlacrimation and fluid retention. Less acute toxicity appears to be associated with weekly docetaxel therapy than with every-3-week docetaxel therapy.

Table 3. Management of docetaxel-specific toxicities

Adverse reaction	Management
Fluid retention: weight gain and peripheral edema related to cumulative dose (5th-7th cycle)	2-3 days of steroid therapy; responsive to diuretics
Skin and nail disorders:	
Palmar-plantar erythrodysesthesia	Good skin and nail care
Onycholysis and soreness (rare)	Cyclooxygenase-2 inhibitors under study
Hyperlacrimation (epiphora)	Instillation of artificial tears
Primarily associated with weekly schedule and cumulative dose >300 mg/m$_2$	Lacrimal canalicular prosthesis

Table 4. Differentiation of the taxanes: a summary

Property	Docetaxel	Paclitaxel
®-tubulin affinity	1.9	1
Cell cycle specificity	S/G$_2$/M	G$_2$/M
Uptake versus efflux	1 versus 1/3	1 versus 1
Pharmacokinetics/pharmacodynamics	Linear	Nonlinear
Drug interactions	No cardiotoxic effects; effects not sequence dependent	Enhanced cardiac toxicity, specifically with anthracyclines; effects are sequence dependent
Neuropathy/myalgias	Less neuropathy	Effect is dose dependent
Hypersensitivity	None	Attributed to Cremophor EL
Neutropenia	Enhanced	Dose dependent
Fluid retention	Reduced or avoided with prophylactic treatment	None

Results of more clinical trials will further define the schedule-dependent differences between the taxanes.

Summary

Clearly, there are differences between the taxanes, ranging from their binding affinity and cell cycle specificity to their toxicity profiles (Table 4). As is often the case with similar compounds, a comparison between agents is rare and difficult to accomplish. Docetaxel and paclitaxel have been compared with one another (as single agents and/or in combination regimens in every-3-week dosing schedules) in patients with metastatic breast, ovarian, and lung cancers, with preliminary or final results now available. Results of these trials and of more clinical trials in various malignancies will further elucidate the clinical differences between the taxanes.

References

1 Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. J Clin Oncol 1999;17:1061-1070.

2 Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. Cancer Res 1997;57:229-233.

3 Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V. S-phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere) in synchronised HeLa cells. Br J Cancer 1995;71:1194-1198.

4 Riou JF, Petitgenet O, Combeau C et al. Cellular uptake and efflux of docetaxel (Taxotere®) and paclitaxel (Taxol®) in P388 cell line. Proc Am Assoc Cancer Res 1994;35:385, abstract 2292.

5 Hanauske AR, Degen D, Hilsenbeck SG et al. Effects of taxotere and taxol on in vitro colony formation of freshly explanted human tumor cells. Anticancer Drugs 1992;3:121-124.

6 Valero V, Jones SE, Von Hoff DD et al. A phase II study of docetaxel in patients with paclitaxel-resistant metastatic breast cancer. J Clin Oncol 1998;16:3362-3368.

7 Verschraegen CF, Sittisomwong T, Kudelka AP et al. Docetaxel for patients with paclitaxel-resistant Mullerian carcinoma. J Clin Oncol 2000;18:2733-2739.

8 Fossella FV, DeVore R, Kerr RN et al. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. J Clin Oncol 2000;18:2354-2362.

9 Mason KA, Hunter NR, Milas M et al. Docetaxel enhances tumor radioresponse in vivo. Clin Cancer Res 1997;3:2431-2438.

10 Milas L, Milas MM, Mason KA. Combination of taxanes with radiation: preclinical studies. Semin Radiat Oncol 1999;9(suppl 1):12-26.

11 Mason K, Staab A, Hunter N et al. Enhancement of tumor radioresponse by docetaxel: involvement of immune system. Int J Oncol 2001;18:599-606.

12 Keng P, Chen Y, Okunieff P. Comparative analysis of docetaxel and paclitaxel: cell cycle and radiosensitization effects in human cancer cell lines. Proc Am Soc Clin Oncol 2000;19:662a.

13 Sparreboom A, van Tellingen O, Nooijen WJ et al. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. Cancer Res 1996;56:2112-2115.

14 Karlsson MO, Molnar V, Freijs A et al. Pharmacokinetic models for the saturable distribution of paclitaxel. Drug Metab Dispos 1999;27:1220-1223.

15 Gianni L, Kearns CM, Giani A et al. Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship in humans. J Clin Oncol 1995;13:180-190.

16 Clarke SJ, Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. Clin Pharmacokinet 1999;36:99-114.

17 Bruno R, Hille D, Riva A et al. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. J Clin Oncol 1998;16:187-196.

18 Burstein HJ, Manola J, Younger J et al. Docetaxel administered on a weekly basis for metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2000;18:1212-1219.

19 Slaviero K, Rivory LP, McLachlan A et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of weekly docetaxel therapy. Proc Am Soc Clin Oncol 2002;21:89a.

20 Gianni L, Munzone E, Capri G et al. Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated breast cancer: high antitumor efficacy and cardiac effects in a dose-finding and sequence-finding study. J Clin Oncol 1995;13:2688-2699.

21 Jassem J, Pienkowski T, Pluzanska A et al. Doxorubicin and paclitaxel versus fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as first-line therapy for women with metastatic breast cancer: final results of a randomized phase III multicenter trial. J Clin Oncol 2001;19:1707-1715.

22 Biganzoli L, Cufer T, Bruning P et al. Doxorubicin (A)/Taxol(T) versus doxorubicin/cyclophosphamide (C) as first line chemotherapy in metastatic breast cancer (MBC): a phase III study. Proc Am Soc Clin Oncol 2000;19:73a.

23 Gianni L, Vigano L, Locatelli A et al. Human pharmacokinetic characteristics and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer. J Clin Oncol 1997;15:1906-1915.

24 Venturini M, Lunardi G, Del Mastro L et al. Sequence effect of epirubicin and paclitaxel treatment on pharmacokinetics and toxicity. J Clin Oncol 2000;18:2116-2125.

25 Esposito M, Venturini M, Vannozzi MO et al. Comparative effects of paclitaxel and docetaxel on the metabolism and pharmacokinetics of epirubicin in breast cancer patients. J Clin Oncol 1999;17:1132-1140.

2.6.2.Corrélation entre polymorphisme d'ABCB1/MDR1 et pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel (article 2)

Ce premier article rapporte l'influence du polymorphisme C3435T (rs1045642) d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel.

Dans la population initiale de notre étude, 86 patientes ont eu une étude de la pharmacocinétique du docétaxel. Les caractéristiques de la population en ce qui concerne les paramètres pouvant influencer les polymorphismes et/ou la pharmacocinétique des traitements anticancéreux sont comparables entre eux et reportés dans le tableau 15.

Tableau 15. Comparaison des caractéristiques des populations de l'article 1 et de la population générale de l'étude.

	Population de l'article (n=86)		Population de l'étude globale (n=106)	
	Moyenne (extrêmes) où n	Données manquantes	Moyenne (extrêmes) où n	Données manquantes
Age au diagnostique (années)	49 (26-76)	0	48 (26-76)	0
Groupe ethnique		0		0
Caucase	66 (77%)		76 (72%)	
Afrique du nord et sub-saharienne	19 (22%)		28 (26%)	
Asie	1 (1%)		2 (2%)	
Statut « ménopausée » à l'inclusion		0		0
Non				
Oui	53 (62%)		65 (61%)	
Age aux ménarches	33 (38%)		41 (39%)	
Age à la ménopause	13 (10-18)	42	13 (10-18)	69
Traitement Hormonal de la Ménopause	49 (42-59)	10	49 (42-59)	17
	13 (48%)	6	19 (46%)	15
Age à la 1ère grossesse				
Parité	26 (15-37)	19	25 (15-37)	26
	2 (0-10)	6	2 (0-10)	11
Fumeuses	11 (17%)	22	13 (19%)	35
Poids (kg)	67 (46-137)	0	66 (46-137)	0
Taille (cm)	163 (149-177)	0	157 (149-180)	0
BMI ($kg.m^{-2}$)	25 (18-53)	0	26 (17-57)	0

La répartition des génotypes des polymorphismes d'ABCB1 étudiés dans la population de l'article et celle de l'étude sont également comparables (tableau 16).

Tableau 16. Comparaison de la fréquence des génotypes d'ABCB1 des populations de l'article 1 et de la population générale de l'étude.

Polymorphisme	Fréquence génotypique dans la population de l'étude (n=106)			Fréquence génotypique dans la population de l'article (n=86)		
rs9282564 A61G						
	AA	GG	AG	AA	GG	AG
	0.90	0.00	0.10	0.91	0.00	0.09
rs1128503 C1236T						
	CC	TT	CT	CC	TT	CT
	0.42	0.14	0.44	0.41	0.15	0.44
rs2032582 G2677W						
	GG	WW	GW	GG	WW	GW
	0.49	0.11	0.40	0.50	0.12	0.37
rs1045642 C3435T						
	CC	TT	CT	CC	TT	CT
	0.39	0.14	0.47	0.04	0.15	0.45
rs3213619						
T-129C	TT	TC	CC	TT	TC	CC
	0.88	0.11	0.01	0.86	0.13	0.001

Nous avons au préalable exploré la corrélation entre les différents polymorphismes d'ABCB1 aux données de la pharmacocinétique du docétaxel et retenu de ne présenter que celles concernant le polymorphisme de l'exon 26 d'ABCB1 (rs1045642) puisqu'il s'agissait du seul qui influençait la pharmacocinétique du docétaxel et ceci uniquement chez les patientes non ménoapausées (n=53).
Les patientes porteuses du génotype CC (40%) avaient une valeur moyenne de l'AUC du docétaxel statistiquement inférieure à celles porteuses des génotypes CT (45%) et TT (15%) ($p<0.0001$).

Nous avons également exploré l'impact des différents polymorphismes d'ABCB1 sur la pharmacocinétique de la doxorubicine sans toutefois pouvoir trouver aucune corrélation (données non publiées).

Par ailleurs nous avons retrouvé également chez les patientes non ménopausées une corrélation hautement statistiquement significative entre des taux d'AUC bas du docétaxel et le diplotype 2677GG-3435CC ainsi que l'haplotype 61AA-1236CC-2677GG-3435CC peut-être du fait d'un lien important entre ces génotypes.

Nous avons donc été les premiers à suggéré un lien entre le polymorphisme d'ABCB1, le statut ménopausique et la pharmacocinétique du docétaxel.

British Journal of Cancer (2010) 103, 560–566
© 2010 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/10
www.bjcancer.com

Effect of *ABCB1* C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients

A Fajac*[,1], J Gligorov[2], K Rezai[3], P Lévy[4], E Lévy[5], F Selle[2], K Beerblock[2], D Avenin[2], P Saintigny[6], S Hugonin[1], J-F Bernaudin[1] and F Lokiec[3]

[1]*Service d'Histologie-Biologie Tumorale, hôpital Tenon, AP-HP, ER2 UPMC Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France;* [2]*Service d'Oncologie, hôpital Tenon, AP-HP, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France;* [3]*Service de Pharmacologie, Centre René Huguenin, 35 rue Dailly, St-Cloud 92210, France;* [4]*Département de Santé Publique, hôpital Tenon, AP-HP, Inserm UMR S 707, Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France;* [5]*Service d'Oncologie, HEGP, AP-HP, 20 rue Leblanc, Paris 75015, France;* [6]*Service d'Oncologie, Hôpital Avicenne, AP-HP, 125 rue Stalingrad, Bobigny 93000, France*

BACKGROUND: It can be hypothesised that inherited polymorphisms in the drug-transporter *ABCB1* gene may interfere with interindividual variations in drug response in breast cancer patients. Docetaxel is a substrate for ABCB1 whose function has been shown to be modulated by oestrogen and progesterone.

METHODS: Whether *ABCB1* polymorphisms including T-129C, A61G, C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms could account for variations in the disposition of docetaxel and whether menopausal status at the time of diagnosis might interact with this effect were analysed in women receiving neoadjuvant chemotherapy for breast cancer ($n = 86$).

RESULTS: A highly significant association was observed, but restricted to premenopausal women ($n = 53$), between the pharmacokinetics of docetaxel and C3435T polymorphism, as patients with CC genotype had lower mean values of the area under the plasma concentration-time curve (AUC) of docetaxel than patients with CT and TT genotypes ($P < 0.0001$). Comparison between pre- and postmenopausal women with the same C3435T genotype yielded a significant difference in docetaxel AUC only for CC genotype ($P < 0.0001$).

CONCLUSION: These results suggest that C3435T polymorphism genotyping and menopausal status at the time of diagnosis might be useful when considering chemotherapy regimens including docetaxel in breast cancer patients.

British Journal of Cancer (2010) **103,** 560–566. doi:10.1038/sj.bjc.6605789 www.bjcancer.com
Published online 13 July 2010
© 2010 Cancer Research UK

Keywords: ABCB1; polymorphisms; docetaxel; pharmacokinetics; breast cancer

Taxanes, drugs frequently used to treat breast cancer, are substrates for the ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCB1 (Scala *et al*, 1997). This protein was initially discovered as an efflux transporter involved in multidrug resistance of tumour cells (Gottesman *et al*, 2002). However, ABCB1 is also physiologically expressed at the apical surface of epithelial cells in various organs responsible for drug disposition such as the intestine, liver and kidney and at the apical surface of endothelial cells controlling the availability of drugs at the blood–tissue interface (Schinkel, 1997). ABCB1 is therefore also involved in drug metabolism by having a role in the so-called phase 0 (efflux of unmodified drug) of the metabolism of xenobiotics.

Breast cancer patients treated with taxanes such as docetaxel show major interindividual variations in drug response, which might be at least partly because of inherited polymorphisms in genes encoding proteins involved in drug efflux including ABCB1 transporter (Relling and Dervieux, 2001; Rodrigues *et al*, 2008). Since the first systematic screening for polymorphisms in *ABCB1* coding region and the report of a functional polymorphism (Hoffmeyer *et al*, 2000), >45 polymorphisms have been described in coding regions, the promoter and non-coding regions (Kroetz *et al*, 2003). The polymorphisms for which the frequency of the variant allele is >5% include the T-129C in the promoter region, the synonymous C1236T (exon 12) and C3435T (exon 26) polymorphisms and the non-synonymous A61G (exon 2) and G2677T/A (exon 21) polymorphisms.

There is evidence that the sex steroids oestrogen and progesterone interfere with ABCB1 function as either substrates and/or regulators of ABCB1 expression. Oestrogens such as oestrone and oestriol have been shown to be a substrate of ABCB1 and to increase ABCB1 protein levels (Kim and Benet, 2004; Evseenko *et al*, 2007). Moreover, although not a substrate of ABCB1, progesterone has been reported to inhibit ABCB1-mediated efflux (Yang *et al*, 1989; Barnes *et al*, 1996; Hamilton *et al*, 2001) and increase *ABCB1* mRNA (Piekarz *et al*, 1993) and ATPase activity (Barnes *et al*, 1996; Kim and Benet, 2004).

To evaluate whether variations in disposition of docetaxel because of *ABCB1* polymorphisms could be involved in the response variability of breast cancer patients, the pharmacokinetics of this drug and inherited polymorphisms of *ABCB1* gene including

*Correspondence: Dr A Fajac; E-mail: anne.fajac@tnn.aphp.fr
Received 13 January 2010; revised 14 June 2010; accepted 16 June 2010; published online 13 July 2010

T-129C, A61G, C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms were analysed. Given that the hallmark of menopause is a decrease in ovarian secretion of oestrogen and progesterone, we analysed the effects of menopausal status at the time of diagnosis on the relationships between *ABCB1* polymorphisms and the pharmacokinetics of docetaxel given in neoadjuvant chemotherapy regimens.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Women with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy were included in this study ($n=86$), namely patients with tumours larger than 20 mm (T2, T3 and T4 tumours) and absence of metastatic disease. Patient characteristics are listed in Table 1. A majority of the patients were Caucasians ($n=66$). Menopausal status at the time of diagnosis was specified. Menopause was defined as amenorrhea for at least 12 months. Mean age at diagnosis was 41 years (range: 26–56) for premenopausal patients and 61 years (range: 50–76) for postmenopausal patients.

Chemotherapy consisted of four cycles of doxorubicin (60 mg m^{-2}) and cyclophosphamide (600 mg m^{-2}) followed by four cycles of docetaxel (100 mg m^{-2}). Trastuzumab was administered to four patients during courses of docetaxel because of the presence of *cerbB2* amplification in tumour cells.

The protocol was approved by the independent ethics committee of Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France and all patients provided written informed consent before inclusion in the study including specific written informed consent for the pharmacogenetic analysis.

Pharmacokinetics of docetaxel

Pharmacokinetic analysis was performed for the first course of docetaxel. A limited sampling strategy was used according to previously reported studies (Baille *et al*, 1997). Five heparinised blood samples (5 ml each) were required: immediately before infusion, 5 min before the end of infusion and 20 min, 2 h and 5 h after the end of infusion. After immediate centrifugation of the blood samples, plasma was stored at −20°C until further analysis. Plasma concentrations of docetaxel were determined using validated high-performance liquid chromatography methods with UV detection (Vergniol *et al*, 1992). The analytical range for docetaxel determination was 25–5000 ng ml^{-1}. Individual drug clearances were estimated from docetaxel population pharmacokinetic parameters (Bruno *et al*, 1998) using the *POST HOC* option of NONMEM (Beal and Sheiner, 1998). The area under the plasma concentration-time curve (AUC) was calculated as AUC = dose/clearance.

Table 1 Patient characteristics ($n=86$)

	Mean (range) or *n* (%)	Missing data *n*
Age at diagnosis (years)	49 (26–76)	0
Ethnic group		0
Caucasian	66 (77%)	
North African and sub-Saharan African	19 (22%)	
Asian	1 (1%)	
Menopausal status[a]		0
Premenopausal	53 (62%)	
Postmenopausal	33 (38%)	
Age at menopause (years)	49 (42–59)	10
Height (cm)	163 (149–177)	0
Weight (kg)	67 (46–137)	0
BMI (kg m^{-2})	25 (18–53)	0
Age at menarche (years)	13 (10–18)	42
Age at full-term pregnancy (years)	26 (15–37)	19
Parity	2 (0–10)	6
Ever hormone replacement therapy use	13 (48%)	6
Current smoker	11 (17%)	22
Tumour stage (T)		0
T2 (size >20 mm and ⩽50 mm)	53 (62%)	
T3 (size >50 mm)	25 (29%)	
T4 (inflammatory)	8 (9%)	
Histologic type of breast cancer		0
IDC	76 (88%)	
ILC	10 (12%)	

Abbreviations: BMI = body mass index; IDC = invasive ductal carcinoma; ILC = invasive lobular carcinoma. [a]Menopausal status refers to the menopausal status at the time of diagnosis. Menopause was defined as amenorrhea for at least 12 months.

Genotype

Genomic DNA was extracted from whole blood (10 ml) using QIAamp DNA blood Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). T-129C (rs3213619), A61G (rs9282564), C1236T (rs1128503) and C3435T (rs1045642) polymorphisms were each analysed using two matching primers and two TaqMan MGB probes labeled with 6-FAM or VIC dye for allelic discrimination (assay IDs: C__27487486_10 and C__7586657_20 for T-129C and C3435T, respectively and custom-designed assays for A61G and C1236T with probes FAM (5′-AACTGAACGATAAAAG-3′) and VIC (5′-TTTAAACTGAACA ATAAAAG-3′) and FAM (5′-TCAGGTTCAGGCCCTT-3′) and VIC (5′-TCAGGTTCAGACCCTT-3′), respectively, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). DNA (2.5 μl) was amplified with TaqMan PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems) and Assay Mix (Applied Biosystems) in a final volume of 25 μl. Forty cycles with denaturation at 92°C, and annealing and extension at 60°C were performed.

For G2677T/A (rs2032582) polymorphism, the analysis was based on PCR-RFLP. The primer sequences designed by Primer3 software were 5′-TGACAAACGTTAGGCTTAAATTACA-3′ and 5′-AAGATTGCTTTGAGGAATGGTT-3′ for 2677F and 2677R, respectively. DNA (2.5 μl) was amplified with 1.25 U Ampli Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 200 nM 2677F and 2677R primers (Proligo, Paris, France), 200 μM dNTP, 4 mM MgCl2 and GeneAmp Gold Buffer (Applied Biosystems) in a final volume of 25 μl. Forty cycles with denaturation at 95°C, annealing at 63°C and extension at 72°C were performed. The 726 bp PCR product (12.5 μl) was submitted to 2.5 U Bse YI (New England Biolabs Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) for 2 h at 37°C or 2.5 U Rsa I (New England Biolabs Ozyme) for 3 h at 37°C. Bse YI cuts at the G nucleotide yielding two fragments (590 and 136 kb). Rsa I enzyme cuts at the nonspecific 509 nucleotide and at the A variant yielding two fragments (508 and 218 kb) if A variant is absent, four fragments (508, 218, 136 and 82 kb) if one A allele is present and three fragments (508, 136 and 82 kb) if two A alleles are present. Digested PCR products were submitted to electrophoresis in Novex 8% TBE gels (Invitrogen, Eragny sur Oise, France).

Statistical analysis

Mean values of AUC and mean values of clearance of docetaxel were compared between groups using the nonparametric Mann–Whitney test for two groups or the nonparametric Kruskal–Wallis test for three or more groups (StatView software, version 5.0; SAS Institute, Cary, NC, USA). Owing to multiple comparisons, statistical significance was defined as $P<0.005$.

RESULTS

Plasma concentrations of docetaxel were determined in the 86 patients. Genotyping results for the T-129C, A61G, C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms, the two most frequent

© 2010 Cancer Research UK

haplotypes for A61G, C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms and the haplotype containing the homozygous variant genotypes, which have a frequency ⩾10%, are shown in Table 2.

Table 2 Number of patients for each genotype of *ABCB1* polymorphisms

Polymorphism	Genotype	Number (%)
T-129C		
	TT	74 (86)
	TC	11 (13)
	CC	1 (1)
A61G	AA	78 (91)
	AG	8 (9)
	GG	0 (0)
C1236T	CC	35 (41)
	CT	38 (44)
	TT	13 (15)
G2677T/A	GG	43 (50)
	GT	32 (37)
	TT	10 (12)
	TA	1 (1)
C3435T	CC	34 (40)
	CT	39 (45)
	TT	13 (15)
61–1236–2677–3435	AA-CC-GG-CC	24 (28)
61–1236–2677–3435	AA-CT-GT-CT	19 (22)
1236–2677–3435	TT-TT-TT	7 (8)

For each polymorphism, the mean AUC of docetaxel was initially compared between each genotype using the nonparametric Mann–Whitney test for two groups or the nonparametric Kruskal–Wallis test for three or more groups. When a significant relationship was found for a polymorphism, pairwise comparisons were then performed between one genotype and the other genotypes for this polymorphism considered as a single group. The same analysis was performed for comparisons of mean clearances between genotypes for each polymorphism. Similar results were obtained whether AUC or clearances were considered as pharmacokinetic parameters for docetaxel. However, there was not always a strict correlation between AUC and clearance for a given genotype. This is probably because of the fact that AUC depends on docetaxel dose, which depends on body surface. The results below will be focused on AUC (for details on clearance, see the corresponding Tables).

A striking association was observed between the pharmacokinetics of docetaxel and menopausal status at diagnosis. Mean values (± standard errors, s.e.) for AUC of docetaxel were lower in premenopausal women ($4124 \pm 612\ \mu g\,h\,l^{-1}$, $n=53$) than in postmenopausal women ($4598 \pm 298\ \mu g\,h\,l^{-1}$, $n=33$, Mann–Whitney test $P=0.0008$) (Figure 1).

The influence of menopausal status on the relationship between *ABCB1* polymorphisms and the pharmacokinetics of docetaxel was analysed. Results regarding the pharmacokinetics of docetaxel according to *ABCB1* polymorphisms in pre- and postmenopausal patients are summarised in Tables 3 and 4, respectively.

A significant association between C3435T polymorphism and the pharmacokinetics of docetaxel was observed in premenopausal women (Kruskal–Wallis test $P=0.0002$ for AUC, Table 3).

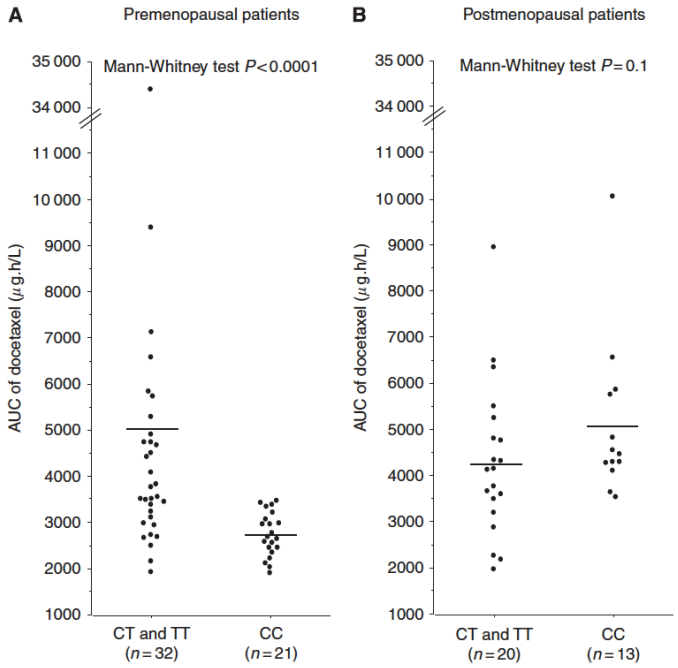


Figure 1 The aera under the plasma concentration-time curve (AUC) of docetaxel according to C3435T polymorphism and menopausal status. In (**A**) exclusion of the outlier patient with an AUC $>34\,000\ \mu g\,h\,l^{-1}$ did not alter the *P*-value. (**A**) Premenopausal patients. (**B**) Postmenopausal patients.

© 2010 Cancer Research UK

Table 3 Pharmacokinetics of docetaxel according to *ABCB1* polymorphisms for premenopausal patients

Premenopausal patients ($n=53$)				
	AUC ($\mu g\,h\,l^{-1}$)		Clearance ($l\,h^{-1}$)	
Genotype (*n*)	**Mean (s.e.)**	**P***	**Mean (s.e.)**	**P***
T-129C				
TT (48)	4251 (673)		50.8 (2.6)	
TC (4)	2779 (330)	0.4	52.8 (5.4)	0.8
CC (1)	3410		58.6	
A61G				
AA (47)	4119 (685)		51.6 (2.6)	
AG (6)	4163(751)	0.4	47.4 (6.5)	0.6
GG (0)				
C1236T				
CC (21)	3148 (236)		56.1 (4.0)	
CT (24)	5115 (1316)	0.09	48.2 (3.6)	0.3
TT (8)	3713 (380)		46.6 (3.2)	
G2677T/A				
GG (26)	3093 (192)		56.9 (3.3)	
GT (20)	5560 (1566)	0.02	45.8 (4.1)	0.05
TT (7)	3849 (410)		44.7 (3.2)	
TA (0)				
GG (26)	3093 (192)	0.005	56.9 (3.3)	0.02
GT and TT and TA (27)	5117 (1166)		46.3 (3.1)	
C3435T				
CC (21)	2727 (104)		61.9 (3.0)	
CT (25)	5431 (1248)	**0.0002**	42.9 (3.4)	**0.0008**
TT (7)	3647 (455)		47.8 (4.4)	
CC (21)	2727 (104)	**<0.0001**	61.9 (3.0)	**0.0002**
CT and TT (32)	5041 (984)		44.0 (2.8)	
2677–3435				
GG-CC (21)	2727 (104)	**<0.0001**	61.9 (3.0)	**0.0002**
Others (32)	5041 (984)		44.0 (2.8)	
61–1236–2677–3435				
AA-CC-GG-CC (15)	2638 (131)	**0.0002**	63.3 (3.9)	**0.002**
Others (38)	4711 (836)		46.3 (2.6)	
61–1236–2677–3435				
AA-CT-GT-CT (13)	6549 (2377)	0.06	43.5 (5.7)	0.08
Others (40)	3336 (179)		53.6 (2.5)	
1236–2677–3435				
CT-GT-CT (17)	5995 (1829)	0.02	44.1 (4.6)	0.06
Others (36)	3241 (166)		54.4 (2.6)	
1236–2677–3435				
TT-TT-TT (4)	4097 (725)	0.4	42.4 (5.3)	0.2
Others (49)	4126 (660)		51.8 (2.5)	

Abbreviations: AUC = plasma concentration-time curve; s.e. = standard error. *Comparisons between groups used the Mann–Whitney test for two groups and the Kruskal–Wallis test for three or more groups. Statistical significance was defined as $P<0.005$ (P values in bold when $P<0.005$).

Table 4 Pharmacokinetics of docetaxel according to *ABCB1* polymorphisms for postmenopausal patients

Postmenopausal patients ($n=33$)				
	AUC ($\mu g\,h\,l^{-1}$)		Clearance ($l\,h^{-1}$)	
Genotype (*n*)	**Mean (s.e.)**	**P***	**Mean (s.e.)**	**P***
T-129C				
TT (26)	4635 (351)	0.8	41.5 (3.4)	0.5
TC (7)	4462 (565)		45.7 (5.9)	
CC (0)				
A61G				
AA (31)	4588 (317)	0.4	43.0 (3.1)	0.4
AG (2)	4765 (15)		33.6 (0.1)	
GG (0)				
C1236T				
CC (14)	4733 (511)		42.2 (4.4)	
CT (14)	4675 (461)	0.9	41.8 (4.7)	0.9
TT (5)	4006 (517)		44.8 (8.7)	
G2677T/A				
GG (17)	4612 (425)		42.0 (3.6)	
GT (12)	4228 (414)	0.4	46.2 (5.9)	0.4
TT (3)	4553 (476)		36.9 (5.0)	
TA (1)	8943		20.1	
GG (17)	4612 (425)	0.8	42.0 (3.6)	0.8
GT and TT and TA (16)	4584 (431)		42.8 (4.8)	
C3435T				
CC (13)	5075 (481)		36.7 (2.8)	
CT (14)	4279 (492)	0.2	46.9 (4.9)	0.3
TT (6)	4309 (539)		44.3 (9.4)	
CC (13)	5075 (481)	0.1	36.7 (2.8)	0.2
CT and TT (20)	4288 (373)		46.1 (4.3)	
2677–3435				
GG-CC (12)	5141 (517)	0.1	36.4 (3.0)	0.2
Others (21)	4288 (356)		45.8 (4.1)	
61–1236–2677–3435				
AA-CC-GG-CC (9)	5507 (645)	0.04	34.7 (3.9)	0.09
Others (24)	4257 (311)		45.3 (3.6)	
61–1236–2677–3435				
AA-CT-GT-CT (6)	4649 (593)	0.8	41.0 (5.8)	0.9
Others (27)	4587 (344)		42.7 (3.4)	
1236–2677–3435				
CT-GT-CT (6)	4649 (593)	0.8	41.0 (5.8)	0.9
Others (27)	4587 (344)		42.7 (3.4)	
1236–2677–3435				
TT-TT-TT (3)	4553 (476)	0.7	36.9 (5.0)	0.6
Others (30)	4603 (326)		43.0 (3.2)	

Abbreviations: AUC = plasma concentration-time curve; s.e. = standard error. *Comparisons between groups used the Mann–Whitney test for two groups and the Kruskal–Wallis test for three or more groups. Statistical significance was defined as $P<0.005$.

The AUC of docetaxel was lower for 3435CC patients than for 3435CT and 3435TT patients considered as a single group (Mann-Whitney test $P<0.0001$, Figure 1A). In postmenopausal women, no significant relationship was found between the pharmacokinetics of docetaxel and C3435T polymorphism (Figure 1B, Table 4).

Analysis of the most frequent ethnic group in the study population, that is, Caucasians, showed that the relationship between 3435CC genotype and lower AUC remained significant in premenopausal women (AUC ± s.e. values ($\mu g\,h\,l^{-1}$): 2816 ± 149 and 5094 ± 1050 for 3435CC ($n=10$) *vs* 3435CT and 3435TT ($n=30$), respectively, Mann–Whitney test $P=0.004$).

Comparison between pre- and postmenopausal women with the same C3435T genotype yielded a significant difference in docetaxel AUC for CC genotype (Mann–Whitney test $P<0.0001$) with lower AUC in premenopausal women (see Tables 3 and 4: mean AUC (s.e.) = 2727 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (104) *vs* 5075 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (481) for pre- *vs*

© 2010 Cancer Research UK

Table 5 Pharmacokinetics of docetaxel according to *ABCB1* polymorphisms for the overall population

Overall population ($n=86$)				
	AUC ($\mu g\,h\,l^{-1}$)		Clearance ($l\,h^{-1}$)	
Genotype (*n*)	**Mean (s.e.)**	***P****	**Mean (s.e.)**	***P****
T-129C				
TT (74)	4386 (452)		47.5 (2.1)	
TC (11)	3850 (447)	0.9	48.3 (4.2)	0.6
CC (1)	3410		58.6	
A61G				
AA (78)	4305 (431)		48.1 (2.0)	
AG (8)	4314 (558)	0.4	44.0 (5.3)	0.5
GG (0)				
C1236T				
CC (35)	3782 (278)		50.5 (3.2)	
CT (38)	4953 (842)	0.4	45.8 (2.9)	0.5
TT (13)	3825 (297)		45.9 (3.7)	
G2677T/A				
GG (43)	3693 (232)		51.0 (2.7)	
GT (32)	5061 (988)	0.1	45.9 (3.3)	0.2
TT (10)	4060 (324)		42.3 (2.8)	
TA (1)	8943		20.1	
GG (43)	3693 (232)	0.06	51.0 (2.7)	0.08
GT and TT and TA (43)	4919 (745)		44.5 (2.6)	
C3435T				
CC (34)	3625 (275)		52.2 (3.0)	
CT (39)	5018 (817)	0.09	44.4 (2.8)	0.2
TT (13)	3953 (347)		46.2 (4.7)	
CC (34)	3625 (275)	0.03	52.2 (3.0)	0.06
CT and TT (52)	4752 (620)		44.8 (2.4)	
2677–3435				
GG-CC (33)	3605 (283)	0.02	52.6 (3.1)	0.04
Others (53)	4743 (608)		44.7 (2.3)	
61–1236–2677–3435				
AA-CC-GG-CC (24)	3714 (380)	0.09	52.6 (4.0)	0.2
Others (62)	4535 (524)		45.9 (2.1)	
61–1236–2677–3435				
AA-CT-GT-CT (19)	5949 (1628)	0.1	42.7 (4.2)	0.2
Others (67)	3840 (189)		49.2 (2.1)	
1236–2677–3435				
CT-GT-CT (23)	5644 (1355)	0.1	43.3 (3.7)	0.2
Others (63)	3818 (193)		49.4 (2.2)	
1236–2677–3435				
TT-TT-TT (7)	4293 (437)	0.3	40.0 (3.6)	0.2
Others (79)	4307 (427)		48.4 (2.0)	

Abbreviations: AUC = plasma concentration-time curve; s.e. = standard error. *Comparisons between groups used the Mann–Whitney test for two groups and the Kruskal–Wallis test for three or more groups. Statistical significance was defined as $P<0.005$.

postmenopausal 3435CC women, respectively). In contrast, no difference in docetaxel AUC was observed between pre- and postmenopausal women with CT genotype (Mann–Whitney test $P=0.8$) and between pre- and postmenopausal women with TT genotype (Mann–Whitney test $P=0.4$) (see Tables 3 and 4: mean AUC (s.e.) = 5431 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (1248) and 4279 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (492) for pre- *vs* postmenopausal 3435CT women, respectively, and 3647 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (455) and 4309 $\mu g\,h\,l^{-1}$ (539) for pre- *vs* postmenopausal 3435TT women, respectively).

No significant association ($P<0.005$) was found between the other polymorphisms analysed and docetaxel pharmacokinetics in premenopausal women (Table 3) or in postmenopausal women (Table 4). The 2677GG-3435CC diplotype and the most frequent 61AA-1236CC-2677GG-3435CC haplotype were significantly associated with lower AUC of docetaxel in premenopausal women (Table 3).

Analysis of the overall population did not show any significant relationship ($P<0.005$) between the pharmacokinetics of docetaxel and any of the *ABCB1* polymorphisms or any combination of *ABCB1* genotypes (Table 5).

DISCUSSION

This study shows an effect of menopausal status at diagnosis on the relationship between C3435T polymorphism of *ABCB*1 gene and the pharmacokinetics of docetaxel in breast cancer patients.

When evaluating the overall population, no association was observed between C3435T polymorphism and the pharmacokinetics of docetaxel, which is in accordance with the few published studies on this topic (Goh *et al*, 2002; Bosch *et al*, 2006; Tran *et al*, 2006; Lewis *et al*, 2007). In contrast, when analysing the population according to menopausal status at time of diagnosis of breast cancer, a highly significant association with docetaxel pharmacokinetics was observed in premenopausal women for this polymorphism ($P<0.0001$), but not in postmenopausal women. Comparison of pre- and postmenopausal women with the same C3435T genotype yielded a significant difference in docetaxel AUC only for the CC genotype ($P<0.0001$) and not for the CT or TT genotypes. Premenopausal CC women had significantly lower AUC than premenopausal (CT and TT) women and CC postmenopausal women. Premenopausal (CT and TT) women had similar AUC to those of postmenopausal CC and postmenopausal (CT and TT) women (see Figure 1). To the best of our knowledge, this is the first report of a specific effect of menopausal status at the time of diagnosis on the role of *ABCB1* polymorphisms in docetaxel disposition. By contrast, such an effect was not observed for doxorubicin in these patients (data not shown), which suggests that the effect is drug specific. A significant relationship ($P=0.001$) between docetaxel pharmacokinetics and C3435T genotype was also found for patients younger than 49 years, which was the mean age at diagnosis (data not shown). As this age is also the mean value of age at menopause, we believe that menopausal status at diagnosis rather than age has an effect on docetaxel pharmacokinetics.

The finding of a highly significant association in premenopausal women between lower AUC of docetaxel and 2677GG-3435CC diplotype and 61AA-1236CC-2677GG-3435CC haplotype is probably because of the strong linkage between these genotypes (Kroetz *et al*, 2003), although this remains to be evaluated in a large series of women receiving docetaxel neoadjuvant chemotherapy.

The 3435CC genotype has usually been associated with higher levels of ABCB1 mRNA and protein and increased drug efflux in normal tissues and tumours (Hoffmeyer *et al*, 2000; Hitzl *et al*, 2001; Tanabe *et al*, 2001; Fellay *et al*, 2002; Vaclavikova *et al*, 2008), although some discrepancies have been reported, especially in Japanese populations (Nakamura *et al*, 2002). It therefore makes sense to observe lower AUC of docetaxel in CC patients, as their higher levels of ABCB1 in organs involved in drug metabolism would result in higher efflux of docetaxel, higher elimination of the drug and subsequently lower AUC. The mechanisms by which this synonymous polymorphism affects ABCB1 function might be a lower mRNA stability of the 3435T variant (Wang *et al*, 2005) and/or a change in substrate binding site conformation of the variant ABCB1 protein (Kimchi-Sarfaty *et al*, 2007). This different protein folding could be due to a different rate of translation when

© 2010 Cancer Research UK

rare codons are used which might be at least partly because of ribosome stalling (Fung and Gottesman, 2009).

Why lower AUC of docetaxel were specifically observed in premenopausal CC women and not in postmenopausal CC women is still unknown. A role for oestrogen and progesterone in modulating ABCB1 expression and function has been shown in various cells with increased ABCB1 expression induced by oestrogen and progesterone at both the mRNA and protein levels (Arceci *et al*, 1990; Kim and Benet, 2004; Evseenko *et al*, 2007). It may be hypothesised that this inductive action of oestrogen and progesterone on ABCB1 could at least partly explain the lower AUC of docetaxel observed in premenopausal women compared with postmenopausal women independently of any effect of C3435T polymorphism. Higher oestrogen and progesterone levels in premenopausal women would induce higher ABCB1 levels and consequently higher efflux of docetaxel. It can be hypothesised that the finding of lower docetaxel AUC only in premenopausal CC women might be due to an additive effect of genotype and hormones on ABCB1 overexpression. However, the hypothesised role of oestrogen and progesterone on docetaxel pharmacokinetics through ABCB1 expression must be interpreted in the light that these women had received previous chemotherapy inducing a possible decrease in oestrogen and progesterone production in premenopausal women (Fornier *et al*, 2005).

A significant association between C1236T polymorphism and docetaxel clearance was reported by Bosch *et al* (2006), as patients homozygous for the variant T allele showed lower clearance. In the present series, in accordance with this report, patients homozygous for the T allele presented a lower docetaxel clearance although not reaching statistical significance (see Table 5).

In conclusion, these results show that menopausal status at diagnosis has an impact on the effect of C3435T polymorphism of *ABCB1* gene on the pharmacokinetics of docetaxel in breast cancer patients. This finding raises the question of whether higher doses of docetaxel should be given to 3435CC premenopausal women. To provide further insight into this issue, we are currently analysing whether C3435T polymorphism is involved in the pathologic response of breast cancer patients receiving docetaxel in their neoadjuvant chemotherapy regimen according to their menopausal status.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC AOR03015) and ACTT (Amis du Centre des Tumeurs de Tenon) for financial support, URC-Est (especially Tabassome Simon) for help in the design of this study, and Florent Soubrier, Serge Uzan and Jean-Pierre Lotz for their constant support.

REFERENCES

Arceci RJ, Baas F, Raponi R, Horwitz SB, Housman D, Croop JM (1990) Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus. *Mol Reprod Dev* 25: 101–109

Baille P, Bruno R, Schellens JH, Webster LK, Millward M, Verweij J, Montay G (1997) Optimal sampling strategies for Bayesian estimation of docetaxel (Taxotere) clearance. *Clin Cancer Res* 3: 1535–1538

Barnes KM, Dickstein B, Cutler GB, Fojo T, Bates SE (1996) Steroid treatment, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *Biochemistry* 35: 4820–4827

Beal SL, Sheiner LB (1998) *NONMEM User's Guide*. NONMEM project group, University of California: San Francisco, CA

Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, Witteveen E, Smit WM, Jansen RL, van Herpen CM, Soesan M, Beijnen JH, Schellens JH (2006) Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 12: 5786–5793

Bruno R, Hille D, Riva A, Vivier N, ten Bokkel Huinnink WW, van Oosterom AT, Kaye SB, Verweij J, Fossella FV, Valero V, Rigas JR, Seidman AD, Chevallier B, Fumoleau P, Burris HA, Ravdin PM, Sheiner LB (1998) Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. *J Clin Oncol* 16: 187–196

Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA (2007) Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos* 35: 595–601

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A, Swiss HIV Cohort Study (2002) Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 359: 30–36

Fornier MN, Modi S, Panageas KS, Norton L, Hudis C (2005) Incidence of chemotherapy-induced, long term amenorrhea in patients with breast carcinoma age 40 years and younger after adjuvant anthracycline and taxane. *Cancer* 104: 1575–1579

Fung KL, Gottesman MM (2009) A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 1794: 860–871

Goh BC, Lee SC, Wang LZ, Fan L, Guo JY, Lamba J, Schuetz E, Lim R, Lim HL, Ong AB, Lee HS (2002) Explaining interindividual variability of docetaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in Asians through phenotyping and genotyping strategies. *J Clin Oncol* 20: 3683–3690

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

Hamilton KO, Yazdanian MA, Audus KL (2001) Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and β-ligands. *Int J Pharm* 228: 171–179

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2001) The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux on the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from $CD56^+$ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 11: 293–298

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3473–3478

Kim WY, Benet LZ (2004) P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression *in vitro*. *Pharm Res* 21: 1284–1293

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A 'silent' polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science* 315: 525–528

Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG (2003) Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 13: 481–494

Lewis LD, Miller AA, Rosner GL, Dowell JE, Valdivieso M, Relling MV, Egorin MJ, Bies RR, Hollis DR, Levine EG, Otterson GA, Millard F, Ratain MJ (2007) A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel between African-American and Caucasian cancer patients: CALGB 9871. *Clin Cancer Res* 13: 3302–3311

Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K (2002) Effect of the mutation C3435T at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 71: 297–303

Piekarz RL, Cohen D, Horwicz SB (1993) Progesterone regulates the murine multidrug resistance mdr1b gene. *J Biol Chem* 268: 7613–7616

Relling MV, Dervieux T (2001) Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 1: 99–108

© 2010 Cancer Research UK

Rodrigues FF, Santos RE, Melo MB, Silva MA, Oliveira AL, Rozenowicz RL, Ulson LB, Aoki T (2008) Corrrelation of polymorphism C3435T of the MDR-1 gene and the response of primary chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res* 7: 177–183

Scala S, Akhmed N, Rao US, Paull K, Lan LB, Dickstein B, Lee JS, Elgemeie GH, Stein WD, Bates SE (1997) P-glycoprotein substrates and antagonists cluster into two distinct groups. *Mol Pharmacol* 51: 1024–1033

Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8: 161–170

Tanabe M, Ieri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K (2001) Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1137–1143

Tran A, Jullien V, Alexandre J, Rey E, Rabillon F, Girre V, Dieras V, Pons G, Goldwasser F, Tréluyer JM (2006) Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1 and GST polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 79: 570–580

Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GIG, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P (2008) Single nucleotide polymorphism in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 18: 263–273

Vergniol JC, Bruno R, Montay G, Frydman A (1992) Determination of Taxotere in human plasma by a semi-automated high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr* 582: 273–278

Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W (2005) Multidrug resistance polypeptide 1 (*MDR1*, *ABCB1*) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 15: 693–704

Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB (1989) Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 264: 782–788

© 2010 Cancer Research UK

2.6.3. Corrélation entre polymorphisme d'ABCB1/MDR1 et réponse aux traitements néoadjuvants par doxorubicine et docétaxel (article 3)

Ce second travail consiste a explorer le lien qu'il existe entre le taux de réponse histologique, le polymorphisme et la pharmacocinétique du docétaxel.

A partir des 106 patientes incluses, 101 ont eu une chirurgie avec évaluation de la réponse histologique de façon centralisée mais 17 d'entre elles n'ont pas eu 8 cycles de chimiothérapie du fait d'une absence de réponse ou d'une progression sous chimiothérapie entrainant une chirurgie précoce :

- 2 patientes n'ont eu qu'un traitement par anthracyclines (2 et 3 cycles respectivement),
- 15 patientes ont eu 4 cycles d'anthracyclines mais 7 d'entre elles sans docétaxel et 8 entre 1 et 3 cycles de docétaxel,
- seules 5 patientes HER2 positives ont reçu du trastuzumab en situation néoadjuvante.

Cinquante cinq patientes ont eu une mastectomie avec curage axillaire et quarante six patientes une chirurgie mammaire conservatrice avec curage axillaire. L'analyse anatomopathologique de la tumeur résiduelle et du curage axillaire a été réalisée de façon standardisée et centralisée par le même anatomopathologiste, ainsi qu'à cette occasion la relecture des biopsies initiales lorsqu'elles ont été disponibles (n=93).

La définition de la réponse histologique utilisée était celle de Sataloff et al [263]. En distinguant toutefois deux situations qui étaient soit celle de la réponse complète histologique avec un impact pronostique, soit celle de la réponse partielle de bonne qualité avec la possibilité d'avoir une chirurgie conservatrice avec un impact esthétique.

L'influence des polymorphismes a été explorée en comparant :

- pour C3435T le génotype CC à CT ou TT
- pour T-129C le génotype TT à TC ou CC
- pour C1236T le génotype CC à CT ou TT et le génotype TT à CC ou CT
- pour G2677W le génotype GG à GT ou TW
- pour A61G le génotype AA à AG

Nous avons également exploré la réponse histologique obtenue en fonction de la pharmacocinétique du docétaxel (n=84, population de l'article 1)

Nous avons trouvé qu'il existait une relation négative entre l'AUC du docétaxel et l'obtention d'une réponse complète histologique. En effet les patientes ayant une AUC du docétaxel en dessous de la médiane de la population générale ont statistiquement moins de chance d'avoir une bonne réponse tumorale même s'il n'y a pas de lien entre taux de réponse complète ou partielle et AUC de façon linéaire. Il semble exister donc une valeur minimale d'AUC du docétaxel afin d'obtenir une réponse.

Par ailleurs, nous avons retrouvé un lien entre réponse tumorale et le polymorphisme d'ABCB1 (génotype C3435T, TT vs CT et CC).

Ce travail est actuellement soumis à Breast Cancer Research and Treatment

Influence of *ABCB1* polymorphisms and docetaxel pharmacokinetics on pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.

Pierre Lévy[1,#], **Joseph Gligorov[2,#,**]**, Martine Antoine[3], Keyvan Rezai[4], Eric Lévy[5], Frédéric Selle[2], Karine Beerblock[2], Danièle Avenin[2], Pierre Saintigny[6], François Lokiec[4], Jean-François Bernaudin[7], Anne Fajac[7#]

[1] Département de Santé Publique, hôpital Tenon, AP-HP, Inserm UMR S 707, Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France [2] Service d'Oncologie, Intergroupe Francilien du sein, hôpital Tenon, AP-HP, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France [3] Service d'Anatomo-Pathologie, hôpital Tenon, AP-HP, ER2 UPMC Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France [4] Service de Pharmacologie, Centre René Huguenin, 35 rue Dailly 92210 St-Cloud, France [5] Service d'Oncologie, Intergroupe Francilien du sein, HEGP, AP-HP, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France [6] Service d'Oncologie, Hôpital Avicenne, AP-HP, 125 rue Stalingrad 93000 Bobigny, France [7] Service d'Histologie-Biologie Tumorale, hôpital Tenon, AP-HP, ER2 UPMC Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France

# Who equally contributed to the study

** To whom correspondence should be addressed: Medical Oncology Department, Francilian Breast intergroup, APHP HUEP Tenon – University Pierre & Marie Curie, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France. Phone: +33156016024. Fax: +33156016543. E-mail: joseph.gligorov@tnn.aphp.fr

Acknowledgments

The authors would like to thank Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and ACTT (Amis du Centre des Tumeurs de Tenon) association for financial support, URC-Est for help in the design of this study, and Jean-Pierre Lotz, Florent Soubrier and Serge Uzan for their constant support.

Funding

This work was supported by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (grant number PHRC AOR03015) and ACTT (Amis du Centre des Tumeurs de Tenon) association.

Key words

Breast cancer, docetaxel pharmacokinetics, ABCB1,polymorphisms,

Abstract

Background: We have previously reported an association between *ABCB1* C3435T polymorphism and docetaxel pharmacokinetics in breast cancer patients. We therefore investigated whether these parameters could account for variations in pathological response.

Patients and methods: Five *ABCB1* polymorphisms including C3435T polymorphism were analyzed in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and docetaxel (n=101). Pathological response was assessed using the Sataloff classification. Pharmacokinetic analysis was performed for the first course of docetaxel (n=84).

Results: No significant association was found between *ABCB1* polymorphisms or docetaxel pharmacokinetics and pathological complete response. C3435T genotype was an independent predictive factor of good response in breast (response greater than 50%, *i.e.* Sataloff T-A and T-B): OR: 4.6 (95% CI: 1.3-16.1), p=0.015, for TT patients versus CT and CC patients. Area under the plasma concentration-time curve (AUC) of docetaxel was the only independent predictive factor of total absence of response in breast (Sataloff T-D): OR: 14.3, (95% CI: 1.7-118), p=0.015, for AUC of docetaxel < 3500 µg.h/L versus ≥ 3500 µg.h/L.

Conclusion: These results suggest that C3435T polymorphism and docetaxel exposure are involved in the response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients and may be useful to optimize individualized therapy.

Translational relevance

The established clinical benefit of neoadjuvant systemic therapy in breast cancer consists of downstaging of tumors to improve surgical options. It is now generally accepted that another goal of this approach is to study the response to chemotherapy, which can involve tumor factors as well as host factors. Drug transporters, such as ABCB1, play a major role in anticancer agent disposition. The results of this study suggest that *ABCB1* C3435T polymorphism and docetaxel pharmacokinetics have an impact on pathological response and are predictive factors that should be taken into account for individualized therapy in breast cancer patients treated in the neoadjuvant setting. Identification of factors predictive of a response greater than 50% in breast, such as 3435TT genotype, may support conservative surgery options. Moreover, possible prediction of no treatment effect by factors, such as low first-course docetaxel AUC or 3435CC and 3435CT genotypes, may lead to earlier treatment switch.

Introduction

The primary established clinical benefit of neoadjuvant systemic therapy in breast cancer consists of downstaging of locally advanced, inflammatory or large tumors to improve surgical options[1] [2]. It has also been demonstrated that the prognosis of the disease is correlated with the absence of residual invasive tumor after neoadjuvant therapy. Among the various chemotherapy regimens used in the neoadjuvant setting, anthracycline- and taxane-based regimens are considered to be the standard of care in breast cancer[3].

Various tumor parameters such as tumor size, grade, estrogen receptor (ER) and cerbB2 status, are known to influence the response of breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy[4] [5]. It can be hypothesized that host genetic factors influencing drug disposition could also be involved in interindividual variations in drug response. Among these genetic factors, the ATP-binding cassette (ABC) efflux drug-transporter, ABCB1, is a potential candidate.

Initially discovered as an efflux transporter involved in multidrug resistance of tumor cells[6], ABCB1 is physiologically expressed in various organs responsible for drug disposition including intestine, liver and kidney and is an efflux transporter for anthracyclines and taxanes[7] . We have previously shown that C3435T polymorphism in *ABCB1* gene was associated with docetaxel pharmacokinetics in breast cancer patients[8]. The area under the plasma concentration-time curve (AUC) of docetaxel was lower for patients with 3435CC genotype and this difference between genotypes was restricted to premenopausal women.

In the present study, we analyzed the pathological response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and docetaxel according to *ABCB1* polymorphisms, including T-129C, A61G, C1236T, G2677T/A

and C3435T polymorphisms, and according to docetaxel pharmacokinetics. Moreover, given that a tumor is characterized by acquired genetic alterations, C3435T polymorphism was also analyzed in breast tumor tissues for a subset of patients in order to assess whether the tumor genotype was the same as the inherited germline genotype.

Patients and Methods

Patients

Women with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy were included in the present study, namely patients with tumors larger than 20 mm (T2, T3 and T4 tumors) and absence of metastatic disease. Of the 106 patients included, 101 were evaluable for pathological response and analyzed in the present study (Fig 1). Chemotherapy consisted of 4 cycles of doxorubicin (60 mg/m^2) and cyclophosphamide (600 mg/m^2) followed by 4 cycles of docetaxel (100 mg/m^2). Fifteen of the 101 patients did not complete the 8 cycles because of disease progression, as assessed by clinical and radiological parameters, and the subsequent decision to perform surgery: 1 patient had incomplete doxorubicin treatment (3 cycles) and no docetaxel and 14 patients had 4 cycles of doxorubicin but no (n=6) or incomplete (1 to 3 cycles) docetaxel treatment (n=8). Trastuzumab was administered to 5 patients with c*erbB2* amplification in tumor cells during courses of docetaxel. Patient characteristics are listed in supplemental Table S1. Most patients were Caucasians (n=73).

The protocol was approved by the Independent Ethics Committee of Pitié-Salpêtrière hospital, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France and all patients provided

written informed consent before inclusion in the study including specific written informed consent for the pharmacogenetic analysis.

Pathological response

To evaluate the pathological response, breast biopsies obtained before chemotherapy and breast tissue and axillary lymph nodes obtained at surgery after chemotherapy were examined. In the case of lumpectomy (n=46), surgically removed breast tissue was sectioned whether or not a macroscopic lesion was present. When a macroscopic lesion was present, different sections representative of the lesion were performed. Sections of breast tissue in the vicinity of the tumor were performed horizontally and perpendicularly to the lesion to delineate the lateral margins and the superficial and deep planes of the tumor. When no macroscopic lesion was present, the entire lumpectomy specimen was examined. In the case of mastectomy (n=55), a dozen tumor sections and two sections of each breast quadrant, the breast center and the nipple were performed. All lymph nodes obtained during axillary dissection were entirely examined when no macroscopic lesion was present. Pathological response was assessed by the same pathologist (MA) using the Sataloff classification[9]. Estrogen or progesterone receptor status was considered positive according to the French guidelines when at least 10% of tumor cell nuclei were immunoreactive. CerbB2 status was assessed according to ASCO guidelines[10].

Genotyping

The method used has been previously reported[8]. Briefly, genomic DNA was extracted from whole blood collected at the time of diagnosis (10 ml) using QIAamp DNA blood Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). T-129C (rs3213619), A61G

(rs9282564), C1236T (rs1128503) and C3435T (rs1045642) polymorphisms were each analyzed using 2 matching primers and 2 TaqMan MGB probes labeled with 6-FAM or VIC dye for allelic discrimination. For G2677T/A (rs2032582) polymorphism, the analysis was based on PCR-RFLP.

Analysis of C3435T polymorphism in breast tumors

Three to five sections (15-20 μm each) from paraffin-embedded tumor samples obtained at surgery were submitted to deparaffinization in ATL buffer (Qiagen) and subsequent DNA extraction using 100 U proteinase K overnight and QIAamp DNA Mini Kit. DNA (125 ng) was amplified for analysis of C3435T polymorphism as reported above. Two other sections cut before and after the sections devoted to C3435T polymorphism analysis were stained with hematoxylin and eosin to check for the presence of tumor cells.

For the 2 patients with different C3435T genotypes in blood and in the tumor obtained at surgery, the results were checked in another blood sample, in another paraffin-embedded tumor sample and in a frozen tumor sample obtained at surgery. Two independent paraffin-embedded tumor samples of the initial biopsy obtained before chemotherapy and checked for the presence of tumor cells were also examined for C3435T polymorphism for these 2 patients.

Pharmacokinetics

Pharmacokinetic analysis was performed for the first course of docetaxel as previously reported[8]. Briefly, a limited sampling strategy was used with 5 heparinized blood samples (5 ml each): immediately before infusion, 5 minutes before the end of

infusion and 20 minutes, 2 hours and 5 hours after the end of infusion[11]. Plasma concentrations of docetaxel were determined using validated high-performance liquid chromatography methods with UV detection[12]. The analytical range for docetaxel determination was 25-5000 ng/ml. Individual drug clearances were estimated from docetaxel population pharmacokinetic parameters[13] using the POSTHOC option of NONMEM[14]. The area under the plasma concentration-time curve (AUC) was calculated as AUC = dose / clearance.

Statistics

Sample size

The sample size was calculated to detect a minimum difference of 30% for complete pathological response between 3435CC patients and (3435CT and 3435TT) patients with a power of 80% and a two-sided type I error of 5%. Given that approximately 25% patients have a complete pathological response and that CC genotype proportion is around 20% in Caucasians, the required number of patients was 100 (Casagrande and Pike method). A difference of 25% between AUC could also be detected with this number of patients (with a power of 80% and a two-sided type I error of 5%).

Definition of response

For analysis of pathological response, complete response (pCR), *i.e.* complete absence of tumor in both the breast and axillary lymph nodes (Sataloff T-A, N-A and T-A, N-B) was primarily considered. As the main objective of neoadjuvant chemotherapy is to reduce tumor size in an attempt to make conservative surgery

feasible, response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B) and total absence of response in breast (Sataloff T-D) were also examined.

Analysis of genotype data

Seven genotypes were analyzed. For C3435T polymorphism, CC genotype was compared to (CT and TT) genotype considered as a single group and TT genotype was compared to (CT and CC) genotype considered as a single group. For the other polymorphisms, analysis was performed taking into account the frequencies of the homozygous variants. For T-129C: TT versus (TC and CC), for A61G: AA versus AG, for C1236T: CC versus (CT and TT) and TT versus (CC and CT), for G2677T/A: GG versus (GT, TT and TA).

Analysis of pharmacokinetic data

AUC of docetaxel was analyzed as a continuous variable. AUC of docetaxel was also analyzed as a qualitative variable. The median value was chosen as the cut-off value *i.e.* 3500 μg.h/L.

Statistical analysis

StatView 5.0 and SAS Enterprise Guide 4.3 software was used. Qualitative variables were analyzed using χ^2-test or, when appropriate, Fisher's exact test. Quantitative variables were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test. Due to multiple testing, significance was defined as $p<0.0025$ (7 genotypes and 3 kinds of response tested). Descending stepwise logistic regression analyses were used to identify the independent predictive factors of response. The significance level was 0.25 for the univariate phase and 0.05 for the multivariate phase.

Results

Results for pathological response using the Sataloff classification are shown in Table 1. Results for genotype analysis of -129C, A61G, C1236T, C3435T and G2677T/A polymorphisms according to pathological response are listed in Table 2.

Complete response (pCR, Sataloff T-A, N-A and T-A, N-B)

Complete response, *i.e.* complete absence of tumor in both the breast and axillary lymph nodes, was primarily analyzed (Sataloff T-A, N-A and T-A, N-B). No significant relationship was found between pCR and any of the genotypes studied (Table 2, all p values ≥ 0.25). However, the pCR rate was 2-fold higher among 3435TT patients compared to 3435CC or 3435CT patients [Table 2, 4/15 (27%) versus 12/86 (14%)]. Pharmacokinetics for the first course of docetaxel were able to be evaluated in 84 patients of the present series. No significant relationship was found between pCR and first-course docetaxel AUC (p=0.9).

Response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B)

A relationship was found between response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B) and 3435TT genotype, (p=0.04, not significant due to adjustment for multiple statistical testing, Table 2). This type of response was observed in 10/15 (67%) patients with 3435TT genotype versus 33/86 (38%) patients with 3435CC or 3435CT genotypes. No significant relationship was found between response greater than 50% in breast and any of the other polymorphisms (Table 2, all p values ≥ 0.15). No significant relationship was found between response greater than 50% in breast and AUC of docetaxel (p=0.7).

Multivariate analysis was performed on the factors identified to be predictive of response greater than 50% in breast on univariate analysis (p≤0.25, supplemental Table S2), namely age, tumor stage, tumor grade, progesterone receptors and C3435T polymorphism. Tumor stage, tumor grade and C3435T polymorphism were found to be independent predictive factors of response greater than 50% in breast (Table 3). Patients with stage T1 or T2 tumor or grade III tumor or 3435TT genotype obtained a better response than the other patients. Patients with 3435TT genotype had a 4.6 odds ratio (OR) (95% CI: 1.3-16.1) of achieving response greater than 50% than patients with CT or CC genotype (p=0.015) which was higher than the ORs for tumor stage and grade.

Absence of response in breast (Sataloff T-D)

No significant relationship was found between absence of response in breast (Sataloff T-D) and any of the polymorphisms (Table 2, all p values ≥ 0.25). Docetaxel AUC was lower for patients with absence of response in breast than for other patients considered as a single group: AUC ± SE values (µg.h/L): 2910 ± 162 (n=11) versus 4514 ± 457 (n=73), (Fig 2) (p=0.007, not significant due to adjustment for multiple testing). However, docetaxel AUC below the median value of docetaxel AUC (3500 µg.h/L) was significantly associated with absence of response in breast (p=0.002, supplemental Table S3).

Multivariate analysis was performed for the predictive factors of absence of response in breast identified on univariate analysis (supplemental Table S3), namely tumor stage, tumor grade, estrogen receptors and AUC of docetaxel. Only docetaxel AUC was found to be an independent predictive factor of absence of response in breast

(OR: 14.3, 95% CI: 1.7-118 p=0.015 for AUC of docetaxel < 3500 µg.h/L versus ≥ 3500 µg.h/L, Table 4).

Analysis of C3435T polymorphism in primary breast tumors

To investigate whether the inherited C3435T genotype, obtained from blood cells, and the C3435T genotype in the primary breast tumor were identical, this polymorphism was analyzed on the residual tumor obtained at surgery for 65 patients. The genotype was the same in blood and tumor for most patients (n=63, 97%), but different for 2 patients. The genotype was CC in blood and CT in the tumor for one patient and TT in blood and CT in the tumor for the other patient. For each of these two patients, the genotype in the initial biopsy obtained before chemotherapy was the same as in blood.

Discussion

Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is a clearly established prognostic factor for disease-free and overall survival in breast cancer[3 15]. In the present study, no significant association was demonstrated between docetaxel pharmacokinetics or any *ABCB1* polymorphism and pCR according to Sataloff classification (T-A, N-A and T-A, N-B).

However, a significant relationship was found between docetaxel pharmacokinetics or C3435T polymorphism and intensity of response. Lower exposure to the first course of docetaxel (AUC<3500 µg.h/L) was an independent predictive factor of absence of response in the primary breast tumor (Sataloff T-D). 3435TT genotype was an independent predictive factor of pathological response greater than 50% in

breast. In each case, the low explained variance (r^2=0.16 and r^2=0.10, respectively) indicates the role of other factors in breast cancer response.

Our results suggest that first-course docetaxel AUC can be considered to be a negative predictive factor of response. The ability to predict total absence of response is clinically relevant in the neoadjuvant setting, as it could modify the treatment strategy. Various treatment options could include switching to surgery or to another systemic treatment or possibly increasing the doses of docetaxel, as the dose-dependent antitumor efficacy of docetaxel has been suggested in several trials. In a large phase 3 trial including 407 patients with advanced breast cancer, increasing docetaxel dose was shown to increase tumor response. For the 69 patients of this study in whom pharmacokinetic analysis was performed, despite the linear relationship between docetaxel dose and AUC, no significant relationship was observed between response rate and AUC, probably because of the small number of patients, as discussed by the authors[16]. Furthermore, in 151 patients treated for metastatic lung cancer, first-course docetaxel AUC was a significant predictor of time to progression[13]. According to certain preclinical data suggesting different mechanisms of action of docetaxel at higher doses[17], the feasibility of increasing docetaxel doses up to 185 mg/m^2 with G-CSF support has been demonstrated in adults and children and a linear relationship has been demonstrated between docetaxel dose and AUC[18 19].

3435TT genotype was found to be significantly associated with response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B). Identification of factors predictive of response greater than 50% in breast is clinically relevant as such factors may

support conservative surgery options. We also found that the pCR rate was twofold higher among 3435TT patients compared to 3435CC and 3435CT patients. The lack of statistical significance may be due to an insufficient sample size, as the number of patients was calculated to show a 30% difference, while this difference in pCR rate was only 13% (see statistical methods).

We also analyzed C3435T genotype in breast tumors obtained at surgery for a subset of patients and showed that the genotype was the same as in blood cells in most patients (97%). Determination of the C3435T genotype in blood, which is technically easier than in the tumor, therefore constitutes a marker at both the host and tumor level. The difference in genotype between the initial tumor and the tumor obtained at surgery observed for 2 patients might be due to drug-induced selection in a tumor with an initially heterogeneous cellular composition or a direct mutagenic effect of the drug.

The finding of 3435TT genotype associated with good response to a regimen containing doxorubicin and docetaxel, which are both effluxed by ABCB1, is functionally relevant, as 3435TT genotype has usually been associated with lower ABCB1 mRNA and protein levels and decreased drug efflux in normal and tumor tissues[20-24]. 3435TT genotype is therefore mostly associated with higher drug exposure of normal tissues and tumor cells.

Few studies have dealt with the response of breast cancer patients according to inherited *ABCB1* polymorphisms[25-27]. 3435TT genotype was more frequently associated with better clinical response[26 27]. Surprisingly, as emphasized by the authors, a single study reported 3435CC genotype to be associated with better clinical response[25-27]. We have previously shown that 3435CC premenopausal patients had lower first-course docetaxel AUC[8]. In the present study, the combination

of docetaxel AUC less than 3500 µg.h/L and 3435CC genotype was associated with poorer response in both the breast and axillary node sites, *i.e.* Sataloff T-D and N-D response (p=0.05, data not shown). This combination is observed only in premenopausal patients and not in postmenopausal patients. The low level of significance may be due to the small number of patients presenting this combination. In a study focusing on pathological response, based on a smaller series of 68 breast cancer patients mostly exposed to an anthracycline-taxane regimen, a similar association of 3435TT genotype was reported with better clinical response but not with pCR[27]. However, the intensity of the pathological response was not analyzed.

In conclusion, as the main objective of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer is to optimize surgical treatment options[3], identification of factors predictive of pathological response, whether positive or negative, is clinically relevant. Indeed, factors predicting a response greater than 50% in breast may support conservative surgery options and factors predicting no treatment effect may lead to earlier treatment switch. Our preliminary results suggest that ABCB1 C3435T polymorphism and first course-docetaxel exposure may be predictive factors of pathological response and may be able to guide individualized therapy in breast cancer patients, particularly when using agents targeting ABCB1[28]. Further studies in larger cohorts are needed to confirm these results.

References

1. Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(19):1539-45.
2. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 2001;19(22):4224-37.
3. Kaufmann M, Morrow M, von Minckwitz G, Harris JR. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer* 2010;116(5):1184-91.
4. Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, Youmsi E, Rajan R, Garbay JR, et al. Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors. *Cancer* 2004;101(5):918-25.
5. Rouzier R, Pusztai L, Delaloge S, Gonzalez-Angulo AM, Andre F, Hess KR, et al. Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8331-9.
6. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):48-58.
7. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;8(3):161-70.
8. Fajac A, Gligorov J, Rezai K, Levy P, Levy E, Selle F, et al. Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients. *Br J Cancer* 2010;103(4):560-6.
9. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995;180(3):297-306.
10. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1323-33.
11. Baille P, Bruno R, Schellens JH, Webster LK, Millward M, Verweij J, et al. Optimal sampling strategies for bayesian estimation of docetaxel (Taxotere) clearance. *Clin Cancer Res* 1997;3(9):1535-8.
12. Vergniol JC, Bruno R, Montay G, Frydman A. Determination of Taxotere in human plasma by a semi-automated high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr* 1992;582(1-2):273-8.
13. Bruno R, Hille D, Riva A, Vivier N, ten Bokkel Huinnink WW, van Oosterom AT, et al. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. *J Clin Oncol* 1998;16(1):187-96.
14. Beal SL, Sheiner LB. NONMEM user's guide; NONMEM project group. 1998.
15. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17(2):460-9.
16. Harvey V, Mouridsen H, Semiglazov V, Jakobsen E, Voznyi E, Robinson BA, et al. Phase III trial comparing three doses of docetaxel for second-line treatment of advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(31):4963-70.
17. Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44(5):355-61.
18. Goncalves A, Viret F, Ciccolini J, Genre D, Gravis G, Giovanini M, et al. Phase I and pharmacokinetic study of escalating dose of docetaxel administered with granulocyte colony-stimulating factor support in adult advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):102-8.

19. Seibel NL, Blaney SM, O'Brien M, Krailo M, Hutchinson R, Mosher RB, et al. Phase I trial of docetaxel with filgrastim support in pediatric patients with refractory solid tumors: a collaborative Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute and Children's Cancer Group trial. *Clin Cancer Res* 1999;5(4):733-7.
20. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359(9300):30-6.
21. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11(4):293-8.
22. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3473-8.
23. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297(3):1137-43.
24. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18(3):263-73.
25. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, Habalova V, Kohut A, Linkova A, et al. MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J* 2010;10(1):62-9.
26. George J, Dharanipragada K, Krishnamachari S, Chandrasekaran A, Sam SS, Sunder E. A single-nucleotide polymorphism in the MDR1 gene as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009;9(3):161-5.
27. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003;22(5):1117-21.
28. Kelly RJ, Draper D, Chen CC, Robey RW, Figg WD, Piekarz RL, et al. A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(3):569-80.

Table 1. Pathological response in the primary breast tumour and axillary lymph nodes using the Sataloff classification (n=101)

	T-A	T-B	T-C	T-D	
N-A	5	1	0	2	8
N-B	11	9	17	4	41
N-C	6	10	16	1	33
N-D	0	1	6	12	19
	22	21	39	19	101

[1] T-A: total or near total therapeutic effect

[2] T-B: > 50% therapeutic effect but less than total or near total

[3] T-C: ≤ 50% therapeutic effect

[4] T-D: no therapeutic effect

[5] N-A: evidence of therapeutic effect, no metastatic disease

[6] N-B: no nodal metastasis or therapeutic effect

[7] N-C: evidence of therapeutic effect but nodal metastasis still present

[8] N-D: metastasis, no therapeutic effect

Table 2. Analysis of pathological response according to *ABCB1* polymorphisms (n=101).

Polymorphism	Genotype	Number (n=101)	Complete response (T-A, N-A and T-A, N-B)		> 50% in breast (T-A and T-B)		No response in breast (T-D)	
			n	p*	n	p*	n	p*
T-129C	TT	88	14	TT vs TC+CC	37	TT vs TC+CC	15	TT vs TC+CC
	TC	12	2	0.90	6	0.80	3	0.25
	CC	1	0		0		1	
A61G	AA	90	14	AA vs AG	37	AA vs AG	16	AA vs AG
	AG	11	2	0.70	6	0.60	3	0.45
	GG	0	0		0		0	
C1236T	CC	40	6	CC vs CT+TT	14	CC vs CT+TT	6	CC vs CT+TT
	CT	46	6	0.85	21	0.20	11	0.45
	TT	15	4	TT vs CT+CC	8	TT vs CT+CC	2	TT vs CT+CC
				0.25		0.35		0.75
G2677T/A	GG	48	9	GG vs	17	GG vs	8	GG vs
	GT	40	4	GT+TT+TA	19	GT+TT+TA	8	GT+TT+TA
	TT	12	3	0.45	7	0.15	3	0.60
	TA	1	0		0		0	
C3435T	CC	38	7	CC vs CT+TT	16	CC vs CT+TT	6	CC vs CT+TT
	CT	48	5	0.60	17	0.95	10	0.55
	TT	15	4	TT vs CT+CC	10	TT vs CT+CC	3	TT vs CT+CC
				0.25		0.04		0.90

Table 3. Multivariate logistic regression analysis of factors predictive of pathological response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B).

	Initial table (n=96)	r^2*=0.12 Hosmer-Lemeshow, p=0.38
	OR (95% CI)	p
Age (years)		
< 50	1	
≥ 50	0.5 (0.2-1.3)	0.2
Tumour stage		
T3-T4	1	
T1-T2	2.9 (1.1-7.6))	0.03
Tumour grade		
I-II	1	
III	2.2 (0.8-6.3)	0.1
PR status		
negative	1	
positive	0.6 (0.2-1.6)	0.3
C3435T		
CC and CT	1	
TT	5.3 (1.4-19.8)	0.01
	Final table (n=98)	r^2*=0.10 Hosmer-Lemeshow, p=0.85
	OR (95% CI)	p
Tumour stage		
T3-T4	1	
T1-T2	2.8 (1.1-7.2)	0.03
Tumour grade		
I-II	1	
III	3.1 (1.2-8.0)	0.015
C3435T		
CC and CT	1	
TT	4.6 (1.3-16.1)	0.015

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval; PR, progesterone receptor.

* r^2= explained variance

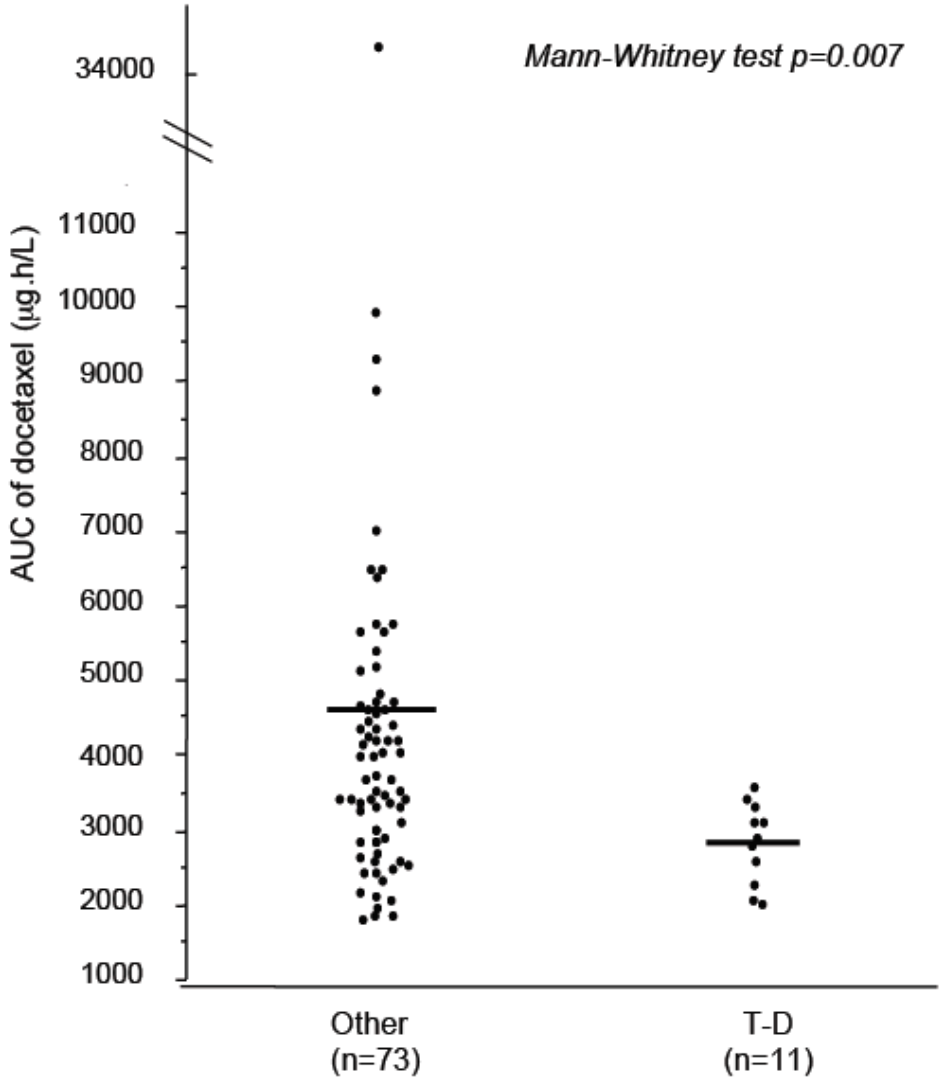
Table 4. Multivariate logistic regression analysis of factors predictive of absence of pathological response in breast (Sataloff T-D).

	Initial table (n=81)	r^2*=0.21 Hosmer-Lemeshow, p=0.90
	OR (95% CI)	p
Tumour stage		
T3-T4	1	
T1-T2	0.4 (0.1-1.8)	0.2
Tumour grade		
I-II	1	
III	3.1 (0.5-18.9)	0.2
ER status		
positive	1	
negative	0.8 (0.2-3.7)	0.8
Docetaxel AUC		
≥ 3500 µg.h/L	1	
< 3500 µg.h/L	11.7 (1.4-100.5)	0.025
	Final table (n=84)	r^2*=0.16 Hosmer-Lemeshow, p=1
	OR (95% CI)	p
Docetaxel AUC		
≥ 3500 µg.h/L	1	
< 3500 µg.h/L	14.3 (1.7-118)	0.015

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval; ER, estrogen receptor.

* r^2= explained variance

Figure 1. AUC of docetaxel according to pathological response in breast (Sataloff T-D: absence of response, other: Sataloff T-A, T-B and T-C)



Supplemental Table S1. Patient characteristics (n=101)

	Mean (range) or n
Age at diagnosis (years)	48 (26-76)
Ethnic group	
Caucasian	73
North African and Sub-Saharan African	26
Asian	2
Menopausal status	
Premenopausal	64
Postmenopausal	37
Histology	
Ductal	88
Lobular	11
Mixed	1
Others	1
Tumour grade	
I	8
II	34
III	56
Not evaluated	3
ER status	
Positive	62
Negative	36
Not evaluated	3
PR status	
Positive	45
Negative	52
Not evaluated	4
cerbB2 status	
0	56
1	19
2	4
3	19
Not evaluated	3
Triple negative	
Yes	22
No	75
Not evaluated	4
Tumour stage	
T1	1
T2	56
T3	35
T4	9

Abbreviations: ER, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor.

Supplemental Table S2. Univariate analysis of factors predictive of pathological response greater than 50% in breast (Sataloff T-A and T-B).

	> 50% (T-A and T-B) n=43	≤ 50% (T-C and T-D) n=58	p*
Age (years)			
< 50	27	29	
≥ 50	16	29	**0.2**
Menopausal status			
premenopausal	28	36	
postmenopausal	15	22	0.75
Tumour stage			
T3-T4	16	28	
T1-T2	27	30	**0.25**
Tumour grade			
I-II	13	29	
III	28	28	
not evaluated	2	1	**0.06**
ER status			
positive	28	34	
negative	14	22	
not evaluated	1	2	0.5
PR status			
positive	16	29	
negative	26	26	
not evaluated	1	3	**0.15**
cerbB2 status			
0-1-2	32	47	
3	10	9	
not evaluated	1	2	0.3
Triple negative			
yes	8	14	
no	34	41	
not evaluated	1	3	0.45
C3435T			
CC and CT	33 (16 and 17)	53 (22 and 31)	
TT	10	5	**0.04**
Docetaxel AUC			
≥ 3500 µg.h/L	21	23	
< 3500 µg.h/L	16	24	
not evaluated	6	11	0.5

Abbreviations: ER, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor.

* : χ^2-test or Fisher's exact test were used.

In bold: factors entered into the subsequent multivariate analysis (p value ≤0.25)

Supplemental Table S3. Univariate analysis of factors predictive of absence of pathological response in breast (Sataloff T-D)

	No response (T-D) n=19	Response (T-A, T-B and T-C) n=82	p*
Age (years)			
< 50	12	44	
≥ 50	7	38	0.45
Menopausal status			
premenopausal	12	52	
postmenopausal	7	30	1
Tumour stage			
T3-T4	12	32	
T1-T2	7	50	**0.06**
Tumour grade			
I-II	5	37	
III	14	42	
not evaluated	0	3	**0.1**
ER status			
positive	9	53	
negative	9	27	
not evaluated	1	2	**0.2**
PR status			
positive	7	38	
negative	10	42	
not evaluated	2	2	0.6
cerbB2 status			
0-1-2	13	66	
3	5	14	
not evaluated	1	2	0.3
Triple negative			
yes	4	18	
no	13	62	
not evaluated	2	2	>0.9
C3435T			
CC	6	32	
CT and TT	13	50	0.5
Docetaxel AUC			
≥ 3500 µg.h/L	1	43	
< 3500 µg.h/L	10	30	
not evaluated	8	9	**0.002**

Abbreviations: ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

* : χ^2-test or Fisher's exact test was used.

In bold: factors entered into the subsequent multivariate analysis (p value ≤0.25)

4. Discussions et perspectives

« L'agresseur est d'autant plus difficile à vaincre qu'il se fait plus intime. »

Jean Bernard (1907-2006*) in L'homme changé par l'homme.*

Les résultats de nos travaux ont permis d'explorer le polymorphisme d'ABCB1 dans la réponse aux chimiothérapies du cancer du sein et d'émettre différentes hypothèses concernant son importance en clinique. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse que l'existence que le statut hormonal estrogénique pouvait être un paramètre physiologique influant la pharmacocinétique des anticancéreux substrats de la P-gp et notamment du docétaxel.

Différents points seront discuter :

- la validité du modèle clinique,
- l'importance du polymorphisme sur la pharmacocinétique et l'efficacité du docétaxel,
- l'importance du statut hormonal sur le métabolisme du docétaxel,
- les possibles paramètres confondants l'analyse de l'importance d'ABCB1 dans le métabolisme du docétaxel,
- les perspectives d'exploitation future de nouvelles données dans cette étude,
- les perspectives d'utilisation en routine de cette approche et son intérêt dans le futur.

3.1. Validité du modèle clinique utilisé

Nous avons exploré l'influence du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel corrélé à l'obtention d'une réponse optimale à ce traitement.

- Le choix du cancer du sein reposait sur la sensibilité déjà établie de ce cancer à cette molécule[59,329,330], et par ailleurs l'importance des taxanes et du docétaxel qui devient une option thérapeutique en situation non métastatique sans l'utilisation des anthracyclines[331-333]. Il paraissait donc important de mieux comprendre les mécanismes potentiels de résistance à ce traitement et plus particulièrement l'importance d'ABCB1 sur la pharmacologie de ce médicament et son efficacité.
- Le choix de l'étude des polymorphismes d'ABCB1 repose sur le fait que les données de la littérature au moment de la mise en place du protocole ne retrouvaient qu'ABCB1 au sein des protéines de la famille MDR comme transporteur du docétaxel et non ABCC1 ou ABCG2 comme nous l'avons discuté dans l'introduction[207]. Par ailleurs, il semble que le mécanisme d'efflux prépondérant du docétaxel passe par ABCB1[106].
- Le choix de la situation néoadjuvante permettait de corroborer la pharmacocinétique à la réponse complète histologique qui demeure un facteur pronostique important et permettra donc avec un recul médian plus important de chercher une corrélation entre le polymorphisme d'ABCB1, La pharmacocinétique des agents anticancéreux utilisés et la survie sans rechute ou la survie globale[334,246]. Il a par ailleurs été retrouvé une corrélation entre certains polymorphismes d'ABCB1 et le pronostic de la maladie dans d'autres modèles tumoraux comme le cancer de l'ovaire[335].
- Le choix de la situation pré-chirurgicale a également permis de s'affranchir des états inflammatoires biologiques post-opératoires entrainant notamment l'élévation de l'orosomucoïde (α1-acid-glycoprotéine) qui est une des protéines vectrices du docétaxel au moment de son administration intraveineuse[88].
- Le choix d'une situation non métastatique a également permis d'éviter des facteurs confondants comme non seulement l'hétérogénéité clonale des

cancers rendant l'évaluation de la réponse au traitement et sa corrélation à la pharmacocinétique du docétaxel plus difficile d'interprétation[336,337], la pré-exposition à des agents de la même famille dans une situation antérieure ayant pu induire des mécanismes de résistance autres[338,339] et enfin un état inflammatoire chronique pouvant là aussi modifier le taux d'orosomucoïde et la pharmacologie du docétaxel[340] .

Le taux de pCR obtenu est plus faible dans notre population par rapport à ce que nous attendions des données de la littérature, toutefois la population traitée avait une taille tumorale initiale plus importante que dans les essais publiés (T3 radiologiques en IRM n=36) et certaines patientes avaient également des cancers inflammatoires (n=10).

Par ailleurs ramené au profil moléculaire tumoral, nous retrouvons dans notre série une efficacité différente en fonction des sous-types comme ceci déjà été rapportés [322] :

- « luminale A » : 0% de pCR
- « luminale B »: 13% de pCR
- « triple négatives » : 26% de pCR
- HER2 positives : 21% de pCR (dont 3 pCR chez les 5 patientes traitées par trastuzumab)

A ce jour notre travail demeure la seule étude clinique ayant exploré l'impact du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique et l'efficacité du docétaxel dans une population de patientes atteintes de cancers du sein en situation non métastatique. D'autres études avaient exploré la corrélation entre polymorphisme et réponse histologique mais non associé à une étude pharmacocinétique des chimiothérapie et avec un nombre très limité de patientes traitées par docétaxel[341] [342].

3.2. Importance du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel

Il existe peu d'études cliniques ayant cherché une corrélation entre certains polymorphismes d'ABCB1, la pharmacocinétique du docétaxel et son efficacité ou sa toxicité (tableau 13). Il s'agit d'études ayant inclus des patients ayant des cancers différents, d'âge variable tous traités par du docétaxel seul ou en association et ayant préalablement été traités par d'autres traitements systémiques pour leurs cancers.

Quatre études ont exploré l'importance du polymorphisme de gènes de résistance et la toxicité du docétaxel[105,106,107,343]. Les résultats sont d'interprétation difficile car les polymorphismes étudiés, les populations cibles ainsi que les pronostics de la maladie sont différents rendant difficile l'interprétation des résultats d'efficacité et de tolérance. Toutefois, on note qu'il existe un lien potentiel entre polymorphisme d'ABCB1 et tolérance du docétaxel au moins dans deux études. Par ailleurs ces travaux soulignent également l'importance potentielle du polymorphisme de certains cytochromes dans la pharmacocinétique du docétaxel[105,343].

Deux études portent sur le cancer de l'ovaire et la population ayant reçu du docétaxel est minoritaire par rapport à celle qui a reçu du paclitaxel en association avec le sel de platine (carboplatine majoritairement) [214,344]. Au sein de ces deux études l'influence du polymorphisme sur l'efficacité et/ou la toxicité du traitement n'est pas clairement démontrée. En ce qui concerne les autres polymorphismes associé, l'étude de Kim et col. retrouve en analyse multivariée que le polymorphisme d'ERCC1 et de GSTπ sont associés à l'efficacité des traitements et au pronostic[344]. Toutefois, on notera que ces patientes recevaient des sels de platine et il apparaît aujourd'hui clairement que le polymorphisme d'ERCC1 puisse influencer l'efficacité de ces traitements[345]. En revanche il est possible que GSTπ puisse modifier la pharmacologie des taxanes et du docétaxel comme ceci a été retrouvé dans d'autres travaux[346].

Trois études ont porté sur le cancer de la prostate métastatique[101,347,348] dont une seule ou les patients étaient traités avec docétaxel seul. Sissung et col. retrouvent un lien entre les polymorphismes G2677W (rs2032582), C1236T (rs1128503) et le pronostic de la maladie[101,347], alors que Narita et col. retrouvent un lien entre le polymorphisme C3435T (rs1045642) et la toxicité d'une polychimiothérapie associant

le docétaxel, le carboplatine et l'estramustine[348]. Nous verrons dans la partie suivante de la discussion l'importance potentielle de la population étudiée et notamment de son sexe ainsi que de son niveau d'imprégnation hormonale.

Trois études portent sur des tumeurs des voies aérodigestives supérieures. Il s'agit de populations asiatiques dans les trois cas. Le travail de Kim et col. explore deux polymorphismes d'ABCB1 dans une population traitée par du docétaxel hebdomadaire pour des cancers du nasopharynx et retrouve une corrélation entre la pharmacocinétique et la toxicité du docétaxel et ces polymorphismes[349]. L'étude de Pan et col. porte sur l'étude d'un seul polymorphisme d'ABCB1 et retrouve une corrélation entre ce polymorphisme et l'efficacité du traitement, mais les patients sont là encore traités par une association de docétaxel et de sels de platine pour un cancer bronchique[350]. Enfin le travail de Shitara et col. retrouve dans le cancer de l'estomac une tendance à une meilleure survie sans progression liée à l'un des polymorphismes d'ABCB1[351].

Cinq études ont porté sur le cancer du sein[99],[352],[353],[354] dont trois en situation non métastatique et deux en situation métastatique ou tous stades confondus. Seule notre travail retrouve un lien entre le polymorphisme d'ABCB1 et la pharmacocinétique et l'efficacité du docétaxel[353]. Les deux études en situation non métastatique comportent un nombre limité de patientes ne permettant probablement pas de conclure ce d'autant que les patientes recevaient un schéma concomitant associant le docétaxel à l'épirubicine et le cyclophosphamide rendant l'interprétation des résultats difficiles. En revanche toutes les études ont exploré des polymorphismes multiples portant notamment sur les cytochromes et ne retrouvent pas de lien.

Tableau 13 (partie 1). Etudes cliniques ayant exploré l'impact du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel.

Population (n)	Tts	Polymorphismes étudiés				Intérêt clinique du polymorphisme d'ABCB1	Réf.
		G2677W (rs2032582)	C3435T (rs1045642)	C1236T (rs1128503)	Autres		
Cancers de l'ovaire stade III post chir. (1077)	**Doc- Carbo, ou Pac-Carbo**	x	x	x	x	**Non démontré**	[214]
Cancers de l'ovaire stadesIII-IV post chir (118)	**Doc-Carbo**	x	x		x	**Non démontré** **Intérêt pronostique du polymorphisme de ERCC1 et GSTπ**	[344]
Cancers du nasopharynx (118)	**Doc hebdo**	x	x		x	**G2677W et C3435T associé à la toxicité et la pharmacocinétique de la chimiothérapie**	[349]
Cancers bronchiques métastatiques (54)	**Doc-Cisp**	x				**G2677W prédictif de la réponse**	[350]
Cancers de l'estomac (100)	**Doc**		x			**C3435T associé à l'efficacité avec une tendance à l'allongement de la pFS mais non à une modification de la survie**	[351]
Cancers prostatiques méta. (73)	**Doc ou Doc-Thal**	x	x	x		**1236CC associé à une meilleure survie** **2677GG associé à une meilleure survie**	[101,347]
Cancers prostatiques méta. (55)	**Doc-Carbo-Estramustine**	x	x	x	x	**C3435T associé à la toxicité de la chimiothérapie**	[348]

Tableau 13. (Partie 2). Etudes cliniques ayant exploré l'impact du polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique du docétaxel.

Population (n)	Tts	Polymorphismes étudiés				Intérêt clinique du polymorphisme d'ABCB1	Réf.
		G2677W	C3435T	C1236T	Autres		
Cancers du sein méta. Patients asiatiques (101)	**Doc**				**x**	**Non démontré**	[99]
Cancers du sein adjuvants Patients asiatiques (59)	**Doc-Epirubicine-Cyclophos.**	**x**	**x**	**x**	**x**	**Non démontré**	[352]
Cancers du sein néoadjuvant (101)	**Doc après doxorubicine**	**x**	**x**	**x**	**x**	**C3435T associé à la la pharmacocinétique de la chimiothérapie et à l'efficacité du traitement**	[353]
Cancers du sein néoadjuvant (68)	**Doc ou Pacli après anthras.**		**x**			**C3435T associé à l'efficacité du traitement**	[341]
Cancers du sein tous stades (98)	**Doc ou Pacli**	**x**	**x**	**x**	**x**	**Non démontré CYP1B1 associés à la toxicité de la chimiothérapie**	[354]
Tous cancers population asiatique (32)	**Doc**		**x**		**x**	**Non démontré Impact du polymorphisme de CYP3A5*3**	[105]
Tous cancers (58)	**Doc**		**x**		**x**	**C3435T, GSTp et CYP3A*1 associés à la toxicité et la pharmacocinétique de la chimiothérapie**	[343]
Tous cancers (92)	**Doc**			**x**	**x**	**C1236T associé à la clairance du docétaxel**	[106]
Tous cancers population asiatique (84)	**Doc**				**x**	**Non démontré**	[107]

Notre étude a permis de retrouver à ce jour que le polymorphisme C3435T d'ABCB1 pouvait influencer la pharmacocinétique du docétaxel, mais également que la qualité de la réponse histologique après chimiothérapie néoadjuvante était liée à ce polymorphisme et à la pharmacocinétique du docétaxel et ceci de façon indépendante.

Le polymorphisme C3435T est un facteur prédictif indépendant de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante comportant un traitement par anthracyclines et docétaxel selon un schéma séquentiel. Ces résultats ne sont pas surprenants car il a été montré que le génotype 3435TT était associé à des taux moindres d'ARNm et de protéine ABCB1, mais surtout une réduction de l'efflux des médicaments dans le tissu normal et la tumeur [208,218,219,220,355]. Si quelques études ont analysé des réponses au traitement en fonction du polymorphisme d'ABCB1, aucune d'entre elle n'est une étude portant de façon homogène sur des traitements similaires et encore moins une évaluation de la réponse histologique[341,342,356].Dans l'étude de Kafka et col. 68 patientes avaient été traitées par anthracyclines et 81% des patientes avaient reçu des taxanes. Il existait une corrélation entre le génotype 3435TT et la réponse clinique sans corrélation avec la réponse clinique anatomopathologique [341]. Dans la série plus petite de Cizmarikova et col. c'est étonnamment le génotype 3435CC qui est associé à une meilleure réponse clinique. Toutefois aucune de ces patientes n'avait reçu de taxanes en situation néoadjuvante et il n'y avait pas d'analyse explorant le lien entre la réponse anatomopathologique et le génotype. Même si nous n'avons pas retrouvé de corrélation stricte entre le génotype 3435TT et la réponse complète histologique, en prenant des critères plus larges comme une réponse tumorale de plus de 50% nous retrouvons clairement que le polymorphisme d'ABCB1 puisse être un élément prédictif de réponse. Ce lien passe certainement par les modifications pharmacologiques du docétaxel[357], mais pas uniquement puisque plusieurs travaux retrouvent un lien entre le polymorphisme d'ABCB1 et le pronostic de certains cancers [355,358,359].

Nordgard et col. retrouvent une corrélation entre un génotype d'ABCB1 portant sur l'exon 11 qui associé à un autre génotype portant sur GSTπ augmente les probabilités d'avoir un cancer du sein avec une mutation de p53[358]. Vaclavikova et col. ont également trouvé une corrélation entre différents génotypes portant sur les exons 12 et 26 d'ABCB1 (notamment 3435TT) et le taux d'expression des récepteurs hormonaux au niveau de la tumeur [355]. Ces constatations supportent l'hypothèse que

les polymorphismes d'ABCB1 puissent indépendamment de l'effet sur la pharmacologie du docétaxel avoir un intérêt pronostique fort car associé à des profils biologiques tumoraux différents. Ceci a été soulevé dans une revue récente de la littérature ou il est toutefois rappelé que les polymorphismes influençant le plus le pronostic des cancers sont liés aux enzymes de détoxification de phase II et notamment les Glutathion-S-transferases (GST)[359].

Nous avons également constaté dans notre travail que la pharmacocinétique du docétaxel impactait la qualité de la réponse histologique. Nous avons retrouvé qu'une AUC de docétaxel <3500mg.h/L était significativement associée à une absence de réponse tumorale tant au niveau de la tumeur primitive que des ganglions axillaires. Si en situation métastatique la dose-intensité du docétaxel est modulable en fonction du profil de tolérance avec un impact limité sur la survie[360], en situation non métastatique et particulièrement néoadjuvante, le respect de la dose-intensité est primordial.

Dans notre première publication, nous rapportions l'effet du génotype 3435CC sur la pharmacologie du docétaxel. Il est probable que ce génotype associé à une plus forte transcription d'ARNm ainsi que d'expression protéique d'ABCB1 soit associé à une augmentation de l'activité MDR et d'efflux dans les tissus normaux et au sein des tumeurs[208 218 220 219 355]. Il paraît donc logique de constater une AUC moindre dans les populations CC. Le mécanisme par lequel ce polymorphisme affecte la fonction d'ABCB1 pourrait être lié à une stabilité moindre de l'ARNm du variant 3435T[361] ou une modification de l'affinité de fixation du substrat sur le récepteur [362] .

Par ailleurs, nous avions rapporté que l'influence du génotype 3435CC sur la pharmacocinétique du docétaxel était liée au statut hormonal de la patiente (ménopausée ou non)[353]. Nous sommes les premiers à trouver ce lien malgré le fait que de nombreuses données de la littérature viennent supporter cette hypothèse d'une pharmacologie différente du docétaxel en fonction de la ménopause.

3.3. Importance du statut hormonal sur le métabolisme du docétaxel

Notre étude retrouve donc une influence du statut hormonal ménopausique sur la pharmacologie du docétaxel potentiellement exacerbée par le polymorphisme C3435T d'ABCB1. Cet effet n'est pas retrouvé avec la doxorubicine suggérant qu'il s'agit bien d'un effet probablement drogue-dépendant.

Les données de pharmacocinétique comparée chez l'homme et la femme retrouvent que la clairance du docétaxel chez les femmes était réduite de 10 à 35% par rapport à celle des hommes [81-83].

Par ailleurs, l'étude clinique PACS01 comparant 6 cycles de FEC100 à 3cycles de FEC100 suivis de 3 cycles de docétaxel en situation adjuvante retrouvait un bénéfice plus indiscutable du docétaxel dans la population de patientes âgées de plus de 50 ans par rapport aux patientes de moins de 50 ans même si l'effectif était plus important dans ce dernier sous-groupe[363].

Le docétaxel est également très utilisé dans le cancer de la prostate et récemment Franke et col. ont publié une étude pharmacologique du docétaxel dans cette population, retrouvant la castration comme principal paramètre influençant l'AUC des patients[364]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que dans cette population une proportion plus importante de docétaxel était métabolisée au niveau hépatique via un transporteur nommé rOat2. Toutefois, la plupart des patients castrés ont une hyperestrogènie relative, et l'hypothèse d'une interaction pharmacologique entre le docétaxel, les estrogènes et ABCB1 est plausible[365].

Nous avons vu dans l'introduction que le métabolisme du docétaxel pouvait être influencé par les estrogènes à plusieurs niveaux modifiant ainsi potentiellement sa pharmacologie. On retiendra surtout que :
- le cytochrome CYP1B1 peut en générant une oxygénation de l'œstrogène induire une inhibition de l'action du docétaxel soit via l'interaction direct estrogène-docétaxel (formation d'adduits) soit en favorisant la fixation de cet œstrogène transformé au niveau de la tubuline empêchant ainsi la fixation du docétaxel sur son site[101,102]

- les hormones stéroïdiennes sont des substrats et des modulateurs de ABCB1[197].

Les résultats que nous avons rapportés méritent d'être revérifié dans le cadre d'une autre étude et à la lumière actuelle des mécanismes d'interaction potentiels entre le métabolisme du docétaxel et les estrogènes.

Ces éléments ont été discutés dans une lettre au JCO (ci-après)

VOLUME 29 · NUMBER 15 · MAY 20 2011

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

CORRESPONDENCE

Castration-Dependent Pharmacokinetics of Docetaxel: Do Sex and/or ABCB1 Polymorphism Also Matter?

TO THE EDITOR: Docetaxel is indicated for treatment of various cancers in different settings. It is likely that several hundreds of thousands of patients throughout the world are (or will be) treated every year with this drug. The preclinical pharmacology data conclude that docetaxel is metabolized in the liver by the cytochrome P450 enzymes and exhibits linear pharmacokinetics; thus, any dose or scheduling adjustment results in proportional modifications in the area under the serum concentration-time curve and maximum concentration.[1] Despite the clinical use of docetaxel for more than 10 years, toxicity remains an important challenge, particularly in weakened populations. Because cancer and comorbidities are associated with aging,[2] toxicity will be more and more frequently a key issue, and any parameters that predict a more favorable benefit-to-risk ratio are potentially clinically meaningful.

For these reasons, we have read with great interest the article by Franke et al[3] that explores the influence of castration on docetaxel pharmacokinetics in patients with metastatic prostate cancer. Interestingly, the authors raise the hypothesis that a higher uptake of docetaxel in the liver of patients who have undergone castration may be the result of a concurrent increased expression of an organic anion transporter called rOat2 that is located on the liver. The authors recommend that "castration – and/or hormone-related changes in the clearance of oncology drugs should be considered as a possible risk factor for treatment failure." We strongly agree with the recommendation, but there are several other parameters that might influence docetaxel pharmacokinetics in the published data.

One of the first publications that related to docetaxel treatment for metastatic breast cancer, by Alexandre et al,[4] emphasized the correlation between decreasing docetaxel efficacy and an existing biologic liver dysfunction. Moreover, it was reported that hepatic function has an impact on the pharmacokinetics of three-weekly[5] or weekly[6] docetaxel. In their publication, Franke et al[3] do not mention any data that relate to a possible connection between docetaxel pharmacokinetics and liver function nor the influence of the different docetaxel dose scheduling.

Gene expression patterns have also been investigated for prediction of docetaxel chemosensitivity in breast cancer. Among the candidate genes, gene encoding for drug transport proteins and *ABCB1* (*MDR1*), in particular, were associated with clinical response to docetaxel.[7,8] *ABCB1* expression and protein folding are largely influenced by three single nucleotide polymorphisms in the *ABCB1* gene, namely 1236C>T, 2677G>T/A (A893S/T), and 3435C>T transversions.[9] More interestingly, Sissung et al[10] found that *ABCB1* polymorphism may influence the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer who are treated with docetaxel. We recently published a report that describes a significant association between *ABCB1* C3435T polymorphism and docetaxel pharmacokinetics in premenopausal women who were treated in a neoadjuvant setting for breast cancer.[11] Our results suggest that C3435T polymorphism genotyping and menopausal status might be useful when considering chemotherapy regimens, including docetaxel in patients with breast cancer. There is also evidence that the sex steroids estrogen and progesterone interfere with ABCB1 function[12] and that ABCB1 increases the efflux of the androgen dihydrotestosterone and reduces androgen-responsive gene activity in prostate tumor cells.[13] In this context, even if Franke et al[3] did not find a correlation between *ABCB1* expression and docetaxel pharmacokinetics, it is not possible to dismiss the idea that *ABCB1* polymorphisms could have influenced docetaxel pharmacokinetics according to androgen deprivation status in their studied population.

Finally, several biomarkers with either prognostic or predictive value may differentiate efficacy or toxicity in men and women.[14] This was demonstrated in cancers in which incidence is not restricted to a particular sex, such as prostate and breast cancers. Those results could explain some differences with respect to parameters that influence drug pharmacokinetics in different tumor types.

Joseph Gligorov, Anne Fajac, and Jean-François Bernaudin
CancerEst, Alliance Pour la Recherche en Cancérologie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris Tenon Hospital, University Paris VI, Paris, France

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Gligorov J, Lotz JP: Preclinical pharmacology of the taxanes: Implications of the differences. Oncologist 9:3-8, 2004 (suppl 2)
2. Smith BD, Smith GL, Hurria A, et al: Future of cancer incidence in the United States: Burdens upon an aging, changing nation. J Clin Oncol 27:2758-2765, 2009
3. Franke RM, Carducci MA, Rudek MA, et al: Castration-dependent pharmacokinetics of docetaxel in patients with prostate cancer. J Clin Oncol 28:4562-4567, 2010
4. Alexandre J, Bleuzen P, Bonneterre J, et al: Factors predicting for efficacy and safety of docetaxel in a compassionate-use cohort of 825 heavily pretreated advanced breast cancer patients. J Clin Oncol 18:562-573, 2000
5. Hooker AC, Ten Tije AJ, Carducci MA, et al: Population pharmacokinetic model for docetaxel in patients with varying degrees of liver function: Incorporating cytochrome P4503A activity measurements. Clin Pharmacol Ther 84:111-118, 2008
6. Slaviero KA, Clarke SJ, McLachlan AJ, et al: Population pharmacokinetics of weekly docetaxel in patients with advanced cancer. Br J Clin Pharmacol 57:44-53, 2004
7. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al: Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. Lancet 362:362-369, 2003
8. Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, et al: Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 108:233-240, 2008
9. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science 315:525-528, 2007

 © 2011 by American Society of Clinical Oncology

10. Sissung TM, Baum CE, Deeken J, et al: ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel. Clin Cancer Res 14: 4543-4549, 2008

11. Fajac A, Gligorov J, Rezai K, et al: Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients. Br J Cancer 103:560-566, 2010

12. Kim WY, Benet LZ: P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. Pharm Res 21:1284-1293, 2004

13. Fedoruk MN, Giménez-Bonafé P, Guns ES, et al: P-glycoprotein increases the efflux of the androgen dihydrotestosterone and reduces androgen responsive gene activity in prostate tumor cells. Prostate 59:77-90, 2004

14. Pal SK, Hurria A: Impact of age, sex, and comorbidity on cancer therapy and disease progression. J Clin Oncol 28:4086-4093, 2010

DOI: 10.1200/JCO.2010.34.5439; published online ahead of print at www.jco.org on April 11, 2011

3.4. Possibles paramètres confondants l'analyse de l'importance d'ABCB1 dans le métabolisme du docétaxel

Nous avons vu également que le métabolisme du docétaxel faisait intervenir plusieurs enzymes en dehors des protéines assurant son efflux. Nous n'avons pas étudié, notamment dans ce travail, l'influence des cytochromes et de leurs polymorphismes ou d'autres protéines comme GSTπ.

Il est connu de longue date que la pharmacocinétique du docétaxel est influencée par la fonction hépatique [64]. C'est pour cela que l'étude des cytochromes et notamment du CYP3A4 peut avoir un intérêt majeur pour la compréhension de la pharmacologie du docétaxel. Nous savons par ailleurs que l'activité de CYP3A peut être évaluée par l'intermédiaire du test respiratoire à l'érythromycine. Plusieurs études retrouvent un lien entre la clairance du docétaxel et l'activité du CYP3A4 [87,97,366] mais il semble qu'en routine ce test sous-estime la part de perturbation du métabolisme du docétaxel lié à des dysfonctions hépatiques (atteintes secondaires, hépatopathies) [98].

Le docétaxel n'est pas un substrat du CYP1B1 mais agit in vitro comme un effecteur de celui-ci et différentes études ont rapporté un lien entre efficacité du docétaxel et présence de CYP1B1*3 [102] [101] ou au contraire surcroit de toxicité[354].

Baker et col. ont récemment étudié l'affinité du docétaxel pour 14 transporteurs en étudiant l'influence de 17 variants[81]. La pharmacocinétique du docétaxel a été étudiée chez 92 patients en cours de traitement. Les transporteurs analysés étaient OATP1B3 (SLCO1B3), CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 et ABCC2 et parmi eux 17 variants. La répartition des différents polymorphismes était comparable à celle connue et décrite au préalable dans la littérature. Les auteurs ont conclu que SLCO1B3 est le transporteur « influx » principal du docétaxel. Par ailleurs aucun des variants n'était associé à une modification de la pharmacocinétique du docétaxel à l'exception de l'association de CYP3A4*1B et CYP3A5*1A qui est associé à une augmentation de 60% de la clairance du docétaxel. De façon intéressante, il a également été retrouvé que CYP3A4*1B n'est présent exclusivement qu'au sein d'un sous-groupe de la population CYP3A5, permettant d'envisager une stratification

dans les études futures concernant l'étude des cytochromes et de la pharmacologie du docétaxel.
Il apparaît de plus en plus évident que plusieurs protéines en fonction de situation physiologiques, voir tumorales différentes modifient de façon conjointe la pharmacocinétique du docétaxel. C'est ainsi que plusieurs études rapportent l'interaction entre les cytochromes P450 et ABCB1.
La bodisponibilité du docétaxel administrée par voie orale est augmentée de façon très importante dans le cas de souris « knock-out » pour les gènes codant ces protéines [67]. La même équipe rapporte en intégrant l'étude de MRP2 qu'en cas de déficience du CYP3A et de ABCB1, l'élimination du docétaxel est assuré en grande partie par ABCC2 (MRP2) [367].

Nous avons également vu l'importance potentielle de GSTπ dans le métabolisme du docétaxel[343]. Certains polymorphismes comme *GSTP1*A/*B* sont associés à une clairance diminuée du docétaxel et explique une toxicité accrue[346].

Nous n'avons pas cherché à identifier dans notre travail toutes les voies métaboliques et les polymorphismes rapportés comme modulant la pharmacologie du docétaxel. Notre approche a été pragmatique car ABCB1 était identifiée comme le transporteur efflux prioritaire modulant la clairance du docétaxel.
Par ailleurs, la complexité métabolique et l'interaction entre ces différentes protéines explique en partie les échecs cliniques concernant la reversion de la résistance de MDR en ne bloquant qu'une cible [368] [369].

5.5. Perspectives

C'est en 1979 que Goldie et Coldman établissent leur théorie de rotation des agents anticancéreux afin de lutter contre les résistances et ainsi obtenir une destruction tumorale[370]. Cette théorie a pourtant été mise en défaut car si l'on admet qu'un clone résistant émerge à la fréquence de 10^{-7} par cellule et par génération alors une maladie résistante à deux agents anticancéreux de mécanisme d'action différent ne devrait survenir qu'à la fréquence de 10^{-14}. Pourtant les constats cliniques quotidiens d'échecs ont été les indices de l'existence d'autres mécanismes de résistance dont MDR est le chef de file.

L'importance de MDR comme cible thérapeutique a été exploré mais la complexité des voies métaboliques pharmacologiques rend à ce jour en partie illusoire d'imaginer que le simple blocage d'un transporteur appartenant à une famille qui en compte 50 et si importants pour le métabolisme cellulaire puisse être une solution rapide et durable.

Notre travail aura permis de comprendre mieux l'importance de la corrélation entre les doses de médicament administré, sa concentration dans l'organisme et un état physiologique qui puisse influencer l'importance d'un polymorphisme révélant peut-être une interaction forte entre ABCB1, le docétaxel et les estrogènes.

Nous avons comparé par ailleurs les polymorphismes d'ABCB1 sur le sang circulant et au sein de la tumeur et avons trouvé une analogie dans 97% des cas. Ceci témoigne d'une part que la pression de sélection existe peut-être mais elle semble peu importante dans notre modèle, mais également qu'une simple prise de sang permet d'étudier un polymorphisme qui pourra être considéré comme un facteur prédictif de réponse dans une population particulière.

Le cancer du sein est une maladie fréquente, et reste classiquement plus grave et plus souvent candidat à une chimiothérapie chez les femmes non ménopausées.

L'existence d'une clairance accrue du docétaxel dans cette population associée à un polymorphisme peut amener à modifier nos stratégies de prise en charge.

Nos résultats méritent d'être reproduits pour pouvoir valider ces nouvelles stratégies ayant pour but d'optimiser l'administration d'un médicament devenu incontournable dans le cancer du sein.

Le recul nécessaire à l'appréciation de l'impact des traitements sur la survie sans progression et la survie globale fait également partie des objectifs de la poursuite de ce travail.

Souhaitant poursuivre l'exploration de l'hypothèse générée par nos résultats concernant le lien entre polymorphisme d'ABCB1, pharmacocinétique du docétaxel et réponse complète histologique, nous prévoyons :
- d'analyser les données de survie sans récidive et de survie globale lorsque nous atteindrons un recul suffisant,
- d'explorer l'importance éventuelle d'autres polymorphismes concernant les protéines impliquées dans le métabolisme du docétaxel.

Par ailleurs, la démonstration d'une excellente corrélation entre le polymorphisme d'ABCB1 au sein de la tumeur et dans le sang circulant nous a permis d'envisager une étude de la corrélation de la valeur prédictive de l'imagerie métabolique par TEP-FDG avant et après initiation de la chimiothérapie néoadjuvante et la réponse complète histologique. Cette étude est en cours de financement pour sa partie biologique.

Mais au delà de la dimension propre de cette étude ne portant que sur un nombre limité de cas, il apparaît que l'approche pharmacogénomique est l'une des dimensions à intégrer dans l'optimisation de la prise en charge personnalisée des patients atteints de cancer.

Cette approche à été considérée comme prioritaire dans une publication récente du JNCI permettant de favoriser l'optimisation de la prise en charge des cancers mais nécessitant la mise en place d'une véritable recherche de transfert portée conjointement par les pharmacologues, les biologistes et les oncologues cliniciens[15].

C'est dans cette approche que nous avons tenté de nous positionner et souhaitons poursuivre nos travaux. Si l'on prend le cas des cancers du sein, leur fragmentation en une multitude de cancers de caractéristiques biologiques parfois différentes nous amène aujourd'hui à construire des essais thérapeutiques reposant sur une hypothèse de ciblage avec des médicaments pouvant être beaucoup plus actifs.

Parmi ces traitements, aussi bien certains agents de chimiothérapie que des inhibiteurs de tyrosine kinases peuvent être le substrat des transporteurs de la famille ABC. Une publication très récente du Cancer Genome Project rapporte l'identification des marqueurs génomiques de sensibilité aux traitements anticancéreux sur des lignées cellulaires parmi lesquelles est retenu pour le docetaxel l'importance de la protéine ABCB1[371].
D'autres médicaments supposent d'autres cibles génomiques et nous avons vu que la réponse à un traitement par anticorps monoclonal thérapeutique peut également dépendre du polymorphisme du récepteur au fragment Fc de cet anticorps modulant le niveau de la réponse immune très probablement.

Poursuivre l'approche d'une médecine personnalisée intégrant l'optimisation de la délivrance et l'efficacité d'un traitement repose donc sur l'intégration de la pharmacogénomique.

Dans cet objectif nous avons souhaité intégrer cette approche dans de futurs essais thérapeutiques.

L'essai IMELDA (phase III internationale dont nous assurons la coordination internationale) qui a inclus 285 patientes en première ligne métastatique du cancer du sein traitée par bévacizumab et docetaxel et ensuite randomisée entre un traitement de maintenance par bévacizumab et capécitabine ou bévacizumab intègre une sous-étude pharmaco-génomique avec étude prévue du polymorphisme et du taux circulant de VEGF-A)

L'essai SAFEHER (phase III internationale dont nous assurons également la coordination internationale) inclura 2500 patientes en situation adjuvante du cancer du sein HER2 positive et évaluera l'impact thérapeutique et la tolérance du trastuzumab sous-cutannée. Des études de pharmacogénomiques sont en cours de discussion avec le sponsor

Une évaluation de l'impact thérapeutique de l'eribuline (substrat potentiel de ABCB1) en fonction du polymorphisme de différents transporteurs membranaires est actuellement en cours de discussion avec les laboratoires EISAI.

L’ensemble de ces projets traduisent notre volonté de poursuivre l’évaluation de l’importance de la pharmaco-génomique dans la médecine personnalisé des cancers.

4. Références bibliographie

1. Pinell P: Naissance d'un fléau. Histoire de la lutte contre le cancer en France (1890-1940) (ed Métaillé), 1992
2. Prat A, Perou CM: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Molecular oncology 5:5-23, 2011
3. Hajdu SI: 2000 years of chemotherapy of tumors. Cancer 103:1097-102, 2005
4. Jones PS, Jones D: New regulatory framework for cancer drug development. Drug Discov Today 17:227-31, 2012
5. Kalow W: Spectrophotometric determination of fluothane vapour. Canadian Anaesthetists' Society journal 4:384-7, 1957
6. Evans DA, Manley KA, Mc KV: Genetic control of isoniazid metabolism in man. British medical journal 2:485-91, 1960
7. Vesell ES: Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. Pharmacology & therapeutics 41:535-52, 1989
8. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L: Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. Pharmacogenetics 8:283-9, 1998
9. Wolinsky H: The thousand-dollar genome. Genetic brinkmanship or personalized medicine? EMBO reports 8:900-3, 2007
10. Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S: Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? Semin Oncol 39:13-25, 2012
11. Bacolod MD, Schemmann GS, Giardina SF, et al: Emerging paradigms in cancer genetics: some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies. Cancer Res 69:723-7, 2009
12. Evans WE, McLeod HL: Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. The New England journal of medicine 348:538-49, 2003
13. Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, et al: Cancer pharmacogenomics. Clin Pharmacol Ther 90:461-6, 2011
14. Ma Q, Lu AY: Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. Pharmacol Rev 63:437-59, 2011
15. Freedman AN, Sansbury LB, Figg WD, et al: Cancer pharmacogenomics and pharmacoepidemiology: setting a research agenda to accelerate translation. J Natl Cancer Inst 102:1698-705, 2010
16. Mendel G: "Versuche über Pflanzen-hybriden" Verhandlungen des naturforschenden Vereines, Abhandlungern, Brünn 4:3-47, 1866
17. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431:931-45, 2004
18. Oppenheimer GM: Paradigm lost: race, ethnicity, and the search for a new population taxonomy. American journal of public health 91:1049-55, 2001
19. Schwartsmann G, Ratain MJ, Cragg GM, et al: Anticancer drug discovery and development throughout the world. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 20:47S-59S, 2002
20. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409:928-33, 2001
21. Kittles RA, Weiss KM: Race, ancestry, and genes: implications for defining disease risk. Annual review of genomics and human genetics 4:33-67, 2003

22. Tishkoff SA, Verrelli BC: Patterns of human genetic diversity: implications for human evolutionary history and disease. Annual review of genomics and human genetics 4:293-340, 2003
23. Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, et al: Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. Science 293:455-62, 2001
24. Allison AC: Polymorphism and Natural Selection in Human Populations. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 29:137-49, 1964
25. Tishkoff SA, Kidd KK: Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. Nature genetics 36:S21-7, 2004
26. Wain LV, Armour JA, Tobin MD: Genomic copy number variation, human health, and disease. Lancet 374:340-50, 2009
27. Campbell NRJ: Biologie, Pearson Education, 2007
28. Pritchard JK: Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? American journal of human genetics 69:124-37, 2001
29. Milano G, Etienne MC: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). Anticancer research 14:2295-7, 1994
30. Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. British journal of clinical pharmacology 64:237-40, 2007
31. Nguyen CM, Mendes MA, Ma JD: Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotyping to predict myelosuppression risk. PLoS currents 3:RRN1236, 2011
32. Marsh S, Hoskins JM: Irinotecan pharmacogenomics. Pharmacogenomics 11:1003-10, 2010
33. Ishikawa T, Onishi Y, Hirano H, et al: Pharmacogenomics of drug transporters: a new approach to functional analysis of the genetic polymorphisms of ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). Biological & pharmaceutical bulletin 27:939-48, 2004
34. Bosch TM: Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in chemotherapy. Methods in molecular biology 448:63-76, 2008
35. Yap TA, Sandhu SK, Workman P, et al: Envisioning the future of early anticancer drug development. Nat Rev Cancer 10:514-23, 2010
36. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, et al: UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. Journal of the National Cancer Institute 99:1290-5, 2007
37. Minami H, Sai K, Saeki M, et al: Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. Pharmacogenetics and genomics 17:497-504, 2007
38. Freyer G, Duret A, Milano G, et al: Pharmacogenetic tailoring of irinotecan-based first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results of a pilot study. Anticancer research 31:359-66, 2011
39. Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI: Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. Molecular pharmacology 62:446-50, 2002
40. Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, et al: Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:5972-8, 2009
41. Krynetski E, Evans WE: Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. Oncogene 22:7403-13, 2003

42. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al: Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. Blood 104:2690-6, 2004

43. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, et al: The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. Breast cancer research and treatment 101:113-21, 2007

44. Jin Y, Desta Z, Stearns V, et al: CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. Journal of the National Cancer Institute 97:30-9, 2005

45. Murdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, et al: Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. Clinical pharmacology and therapeutics 89:708-17, 2011

46. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE: Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annual review of medicine 57:119-37, 2006

47. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S: Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:4390-9, 2010

48. Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, et al: Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. Pharmacogenetics 10:217-23, 2000

49. Deporte-Fety R, Picot M, Amiand M, et al: High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for quantification of dihydrofluorouracil in human lymphocytes: application to measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications 762:203-9, 2001

50. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al: Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer cell 2:117-25, 2002

51. Goulden S, Sutcliffe F, Stevens A: NICE guidance on dasatinib, high-dose imatinib, and nilotinib for patients with CML who are resistant or intolerant to imatinib. The lancet oncology 13:127-8, 2012

52. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine 350:2129-39, 2004

53. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine 352:786-92, 2005

54. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:2091-6, 2009

55. Wall ME, Wani MC: Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. Journal of ethnopharmacology 51:239-53; discussion 253-4, 1996

56. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277:665-7, 1979

57. Torres K, Horwitz SB: Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. Cancer research 58:3620-6, 1998
58. Guenard D, Gueritte-Voegelein F, Dubois J, et al: Structure-activity relationships of Taxol and Taxotere analogues. Journal of the National Cancer Institute. Monographs:79-82, 1993
59. Nabholtz JM, Gligorov J: The role of taxanes in the treatment of breast cancer. Expert opinion on pharmacotherapy 6:1073-94, 2005
60. RPC SPdV: RPC Cancers du sein 2011. Oncologie 13, 2011
61. Morris PG, Fornier MN: Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:7167-72, 2008
62. Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. Nature reviews. Cancer 4:253-65, 2004
63. Wang LG, Liu XM, Kreis W, et al: The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. Cancer chemotherapy and pharmacology 44:355-61, 1999
64. Gligorov J, Lotz JP: Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. The oncologist 9 Suppl 2:3-8, 2004
65. Mason K, Staab A, Hunter N, et al: Enhancement of tumor radioresponse by docetaxel: Involvement of immune system. International journal of oncology 18:599-606, 2001
66. Bijman MN, van Nieuw Amerongen GP, Laurens N, et al: Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. Molecular cancer therapeutics 5:2348-57, 2006
67. van Waterschoot RA, Lagas JS, Wagenaar E, et al: Absence of both cytochrome P450 3A and P-glycoprotein dramatically increases docetaxel oral bioavailability and risk of intestinal toxicity. Cancer research 69:8996-9002, 2009
68. Extra JM, Rousseau F, Bruno R, et al: Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976; NSC 628503) given as a short intravenous infusion. Cancer research 53:1037-42, 1993
69. Pazdur R, Newman RA, Newman BM, et al: Phase I trial of Taxotere: five-day schedule. Journal of the National Cancer Institute 84:1781-8, 1992
70. Burris H, Irvin R, Kuhn J, et al: Phase I clinical trial of taxotere administered as either a 2-hour or 6-hour intravenous infusion. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 11:950-8, 1993
71. Bissett D, Setanoians A, Cassidy J, et al: Phase I and pharmacokinetic study of taxotere (RP 56976) administered as a 24-hour infusion. Cancer research 53:523-7, 1993
72. Tomiak E, Piccart MJ, Kerger J, et al: Phase I study of docetaxel administered as a 1-hour intravenous infusion on a weekly basis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 12:1458-67, 1994
73. Taguchi T, Furue H, Niitani H, et al: [Phase I clinical trial of RP 56976 (docetaxel) a new anticancer drug]. Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy 21:1997-2005, 1994
74. Hudis CA, Seidman AD, Crown JP, et al: Phase II and pharmacologic study of docetaxel as initial chemotherapy for metastatic breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 14:58-65, 1996

75. Bruno R, Sanderink GJ: Pharmacokinetics and metabolism of Taxotere (docetaxel). Cancer surveys 17:305-13, 1993

76. Loos WJ, Baker SD, Verweij J, et al: Clinical pharmacokinetics of unbound docetaxel: role of polysorbate 80 and serum proteins. Clinical pharmacology and therapeutics 74:364-71, 2003

77. Puisset F, Chatelut E, Dalenc F, et al: Dexamethasone as a probe for docetaxel clearance. Cancer chemotherapy and pharmacology 54:265-72, 2004

78. Baker SD, Sparreboom A, Verweij J: Clinical pharmacokinetics of docetaxel : recent developments. Clinical pharmacokinetics 45:235-52, 2006

79. Clarke SJ, Rivory LP: Clinical pharmacokinetics of docetaxel. Clinical pharmacokinetics 36:99-114, 1999

80. ten Tije AJ, Verweij J, Carducci MA, et al: Prospective evaluation of the pharmacokinetics and toxicity profile of docetaxel in the elderly. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23:1070-7, 2005

81. Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, et al: Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. Clinical pharmacology and therapeutics 85:155-63, 2009

82. Rudek MA, Sparreboom A, Garrett-Mayer ES, et al: Factors affecting pharmacokinetic variability following doxorubicin and docetaxel-based therapy. European journal of cancer 40:1170-8, 2004

83. Kloft C, Wallin J, Henningsson A, et al: Population pharmacokinetic-pharmacodynamic model for neutropenia with patient subgroup identification: comparison across anticancer drugs. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12:5481-90, 2006

84. Extra JM, Rousseau F, Culine S, et al: New cytotoxic drugs in clinical development. Nouvelle revue francaise d'hematologie 33:451-6, 1991

85. Lewis LD, Miller AA, Rosner GL, et al: A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel between African-American and Caucasian cancer patients: CALGB 9871. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13:3302-11, 2007

86. Minami H, Kawada K, Sasaki Y, et al: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of protein-unbound docetaxel in cancer patients. Cancer science 97:235-41, 2006

87. Puisset F, Alexandre J, Treluyer JM, et al: Clinical pharmacodynamic factors in docetaxel toxicity. British journal of cancer 97:290-6, 2007

88. Hanada K, Yamanaka E, Yamamoto N, et al: Effects of surgery and chronic disease states on the concentrations and phenotype distribution of alpha1-acid glycoprotein: studies in patients with breast cancer and patients with chronic inflammatory disease. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 49:415-21, 2011

89. Holmes FA, Rowinsky EK: Pharmacokinetic profiles of doxorubicin in combination with taxanes. Seminars in oncology 28:8-14, 2001

90. D'Incalci M, Schuller J, Colombo T, et al: Taxoids in combination with anthracyclines and other agents: pharmacokinetic considerations. Seminars in oncology 25:16-20, 1998

91. Esposito M, Venturini M, Vannozzi MO, et al: Comparative effects of paclitaxel and docetaxel on the metabolism and pharmacokinetics of epirubicin in breast cancer patients. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 17:1132, 1999

92. Leveque D, Gigou L, Bergerat JP: Clinical pharmacology of trastuzumab. Current clinical pharmacology 3:51-5, 2008

93. Nabholtz JM, Gligorov J: Docetaxel/trastuzumab combination therapy for the treatment of breast cancer. Expert opinion on pharmacotherapy 6:1555-64, 2005

94. Bissery MC, Vrignaud P, Lavelle F: Preclinical profile of docetaxel (taxotere): efficacy as a single agent and in combination. Seminars in oncology 22:3-16, 1995

95. Piccart MJ, Klijn J, Paridaens R, et al: Corticosteroids significantly delay the onset of docetaxel-induced fluid retention: final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Investigational Drug Branch for Breast Cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 15:3149-55, 1997

96. Puisset F, Chatelut E, Sparreboom A, et al: Dexamethasone as a probe for CYP3A4 metabolism: evidence of gender effect. Cancer chemotherapy and pharmacology 60:305-8, 2007

97. Slaviero KA, Clarke SJ, McLachlan AJ, et al: Population pharmacokinetics of weekly docetaxel in patients with advanced cancer. British journal of clinical pharmacology 57:44-53, 2004

98. Hooker AC, Ten Tije AJ, Carducci MA, et al: Population pharmacokinetic model for docetaxel in patients with varying degrees of liver function: incorporating cytochrome P4503A activity measurements. Clinical pharmacology and therapeutics 84:111-8, 2008

99. Hor SY, Lee SC, Wong CI, et al: PXR, CAR and HNF4alpha genotypes and their association with pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel and doxorubicin in Asian patients. The pharmacogenomics journal 8:139-46, 2008

100. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, et al: Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. Cancer chemotherapy and pharmacology 64:35-43, 2009

101. Sissung TM, Danesi R, Price DK, et al: Association of the CYP1B1*3 allele with survival in patients with prostate cancer receiving docetaxel. Molecular cancer therapeutics 7:19-26, 2008

102. Sissung TM, Price DK, Sparreboom A, et al: Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. Molecular cancer research : MCR 4:135-50, 2006

103. Engels FK, Loos WJ, Mathot RA, et al: Influence of ketoconazole on the fecal and urinary disposition of docetaxel. Cancer chemotherapy and pharmacology 60:569-79, 2007

104. Hahn NM, Marsh S, Fisher W, et al: Hoosier Oncology Group randomized phase II study of docetaxel, vinorelbine, and estramustine in combination in hormone-refractory prostate cancer with pharmacogenetic survival analysis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12:6094-9, 2006

105. Goh BC, Lee SC, Wang LZ, et al: Explaining interindividual variability of docetaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in Asians through phenotyping and genotyping strategies. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 20:3683-90, 2002

106. Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, et al: Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. Clinical

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12:5786-93, 2006

107. Kiyotani K, Mushiroda T, Kubo M, et al: Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. Cancer science 99:967-72, 2008

108. Shou M, Martinet M, Korzekwa KR, et al: Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. Pharmacogenetics 8:391-401, 1998

109. Figg WD, Chau CH: Heterogeneity in drug disposition determines interindividual variability of docetaxel pharmacokinetics. Cancer biology & therapy 5:840-1, 2006

110. Tran A, Jullien V, Alexandre J, et al: Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1, and GST polymorphisms. Clin Pharmacol Ther 79:570-80, 2006

111. Engels FK, Mathot RA, Loos WJ, et al: Influence of high-dose ketoconazole on the pharmacokinetics of docetaxel. Cancer biology & therapy 5:833-9, 2006

112. Yong WP, Wang LZ, Tham LS, et al: A phase I study of docetaxel with ketoconazole modulation in patients with advanced cancers. Cancer chemotherapy and pharmacology 62:243-51, 2008

113. Rochat B, Morsman JM, Murray GI, et al: Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 296:537-41, 2001

114. Bournique B, Lemarie A: Docetaxel (Taxotere) is not metabolized by recombinant human CYP1B1 in vitro, but acts as an effector of this isozyme. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 30:1149-52, 2002

115. Carnell DM, Smith RE, Daley FM, et al: Target validation of cytochrome P450 CYP1B1 in prostate carcinoma with protein expression in associated hyperplastic and premalignant tissue. International journal of radiation oncology, biology, physics 58:500-9, 2004

116. Brandi G, de Rosa F, Danesi R, et al: Durable complete response to frontline docetaxel in an advanced prostate cancer patient with favourable CYP1B1 isoforms: suggestion for changing paradigms? European urology 54:938-41, 2008

117. Figg WD, Li H, Sissung T, et al: Pre-clinical and clinical evaluation of estramustine, docetaxel and thalidomide combination in androgen-independent prostate cancer. BJU international 99:1047-55, 2007

118. Mulkidjanian AY, Galperin MY, Koonin EV: Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. Trends in biochemical sciences 34:206-15, 2009

119. Jones PM, O'Mara ML, George AM: ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. Trends in biochemical sciences 34:520-31, 2009

120. Schinkel AH, Jonker JW: Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Advanced drug delivery reviews 55:3-29, 2003

121. Dean M, Allikmets R: Complete characterization of the human ABC gene family. Journal of bioenergetics and biomembranes 33:475-9, 2001

122. Klein I, Sarkadi B, Varadi A: An inventory of the human ABC proteins. Biochimica et biophysica acta 1461:237-62, 1999

123. Rees DC, Johnson E, Lewinson O: ABC transporters: the power to change. Nature reviews. Molecular cell biology 10:218-27, 2009

124. Dawson RJ, Locher KP: Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP. FEBS letters 581:935-8, 2007

125. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al: ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nat Rev Cancer 10:147-56, 2010

126. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, et al: P-glycoprotein: from genomics to mechanism. Oncogene 22:7468-85, 2003

127. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 258:1650-4, 1992

128. Munoz M, Henderson M, Haber M, et al: Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. IUBMB life 59:752-7, 2007

129. Vander Borght S, Komuta M, Libbrecht L, et al: Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 28:1370-80, 2008

130. Filipits M, Suchomel RW, Dekan G, et al: MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2:1231-7, 1996

131. Oevermann L, Scheitz J, Starke K, et al: Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. International journal of cancer. Journal international du cancer 124:2303-11, 2009

132. Hanada S, Maeshima A, Matsuno Y, et al: Expression profile of early lung adenocarcinoma: identification of MRP3 as a molecular marker for early progression. The Journal of pathology 216:75-82, 2008

133. Konig J, Hartel M, Nies AT, et al: Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. International journal of cancer. Journal international du cancer 115:359-67, 2005

134. Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, et al: Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. Cancer research 51:2720-6, 1991

135. Oda Y, Saito T, Tateishi N, et al: ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human soft tissue sarcomas. International journal of cancer. Journal international du cancer 114:854-62, 2005

136. Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, et al: ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12:4357-63, 2006

137. Norris MD, Smith J, Tanabe K, et al: Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. Molecular cancer therapeutics 4:547-53, 2005

138. Mochida Y, Taguchi K, Taniguchi S, et al: The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdr1a suppresses polyp formation in Apc(Min/+) mice. Carcinogenesis 24:1219-24, 2003

139. Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ: P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. Blood 93:1075-85, 1999

140. Lehne G, Sorensen DR, Tjonnfjord GE, et al: The cyclosporin PSC 833 increases survival and delays engraftment of human multidrug-resistant leukemia cells in xenotransplanted NOD-SCID mice. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K 16:2388-94, 2002

141. Peaston AE, Gardaneh M, Franco AV, et al: MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. British journal of cancer 85:1564-71, 2001

142. Kuss BJ, Corbo M, Lau WM, et al: In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: a potential role in neuroblastoma therapy. International journal of cancer. Journal international du cancer 98:128-33, 2002

143. Robbiani DF, Finch RA, Jager D, et al: The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. Cell 103:757-68, 2000

144. van de Ven R, Scheffer GL, Reurs AW, et al: A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. Blood 112:2353-9, 2008

145. Miletti-Gonzalez KE, Chen S, Muthukumaran N, et al: The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. Cancer research 65:6660-7, 2005

146. Zochbauer-Muller S, Filipits M, Rudas M, et al: P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. Anticancer research 21:119-24, 2001

147. Heimerl S, Bosserhoff AK, Langmann T, et al: Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. Melanoma research 17:265-73, 2007

148. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al: The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis 30:377-86, 2009

149. Holla VR, Backlund MG, Yang P, et al: Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia. Cancer prevention research 1:93-9, 2008

150. Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, et al: Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. Nature medicine 3:1275-9, 1997

151. Hannun YA, Obeid LM: Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nature reviews. Molecular cell biology 9:139-50, 2008

152. Dong J, Yang G, McHaourab HS: Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. Science 308:1023-8, 2005

153. Juliano RL, Ling V: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochimica et biophysica acta 455:152-62, 1976

154. Bates SE: Solving the problem of multidrug resistance: ABC transporters in clinical onclogy, in Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, et al (eds): ABC Proteins: From Bacteria to MAn, Academic Press, New York, NY., 2003, pp 359-391

155. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84:7735-8, 1987

156. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al: Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 37:159-64, 1989

157. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al: Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 77:491-502, 1994

158. Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, et al: The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. Biochemical and biophysical research communications 141:956-62, 1986

159. Chen CJ, Clark D, Ueda K, et al: Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. The Journal of biological chemistry 265:506-14, 1990

160. Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, et al: A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:4486-90, 1988

161. Ishikawa T, Hirano H, Onishi Y, et al: Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses. Drug metabolism and pharmacokinetics 19:1-14, 2004

162. Sauna ZE, Smith MM, Muller M, et al: The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. Journal of bioenergetics and biomembranes 33:481-91, 2001

163. Sauna ZE, Ambudkar SV: Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. The Journal of biological chemistry 276:11653-61, 2001

164. Chin KV, Chauhan SS, Pastan I, et al: Regulation of mdr RNA levels in response to cytotoxic drugs in rodent cells. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research 1:361-5, 1990

165. Thorgeirsson SS, Huber BE, Sorrell S, et al: Expression of the multidrug-resistant gene in hepatocarcinogenesis and regenerating rat liver. Science 236:1120-2, 1987

166. Cohen D, Piekarz RL, Hsu SI, et al: Structural and functional analysis of the mouse mdr1b gene promoter. The Journal of biological chemistry 266:2239-44, 1991

167. Ueda K: [Multidrug resistance of cancer cells mediated by ABC superfamily transporters]. Nippon Rinsho 55:1024-9, 1997

168. Kuwano M, Oda Y, Izumi H, et al: The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. Molecular cancer therapeutics 3:1485-92, 2004

169. van der Bliek AM, Borst P: Multidrug resistance. Advances in cancer research 52:165-203, 1989

170. Mickley LA, Spengler BA, Knutsen TA, et al: Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR-1 gene activation. The Journal of clinical investigation 99:1947-57, 1997

171. Huff LM, Lee JS, Robey RW, et al: Characterization of gene rearrangements leading to activation of MDR-1. The Journal of biological chemistry 281:36501-9, 2006

172. Grandjean-Forestier FS, C. Robert, J. Verdier, M. Ratinaud, M.H.: ABC Transporters and Multidrug Resistance, in Boumendjel AB, J. Robert, J. (ed), Willey & Sons, 2009, pp 460

173. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, et al: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell 47:381-9, 1986

174. Goodfellow HR, Sardini A, Ruetz S, et al: Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein. The Journal of biological chemistry 271:13668-74, 1996

175. Sauna ZE, Smith MM, Muller M, et al: Evidence for the vectorial nature of drug (substrate)-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The Journal of biological chemistry 276:33301-4, 2001

176. Bruggemann EP, Germann UA, Gottesman MM, et al: Two different regions of P-glycoprotein [corrected] are photoaffinity-labeled by azidopine. The Journal of biological chemistry 264:15483-8, 1989

177. Greenberger LM: Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. The Journal of biological chemistry 268:11417-25, 1993

178. Zhang X, Collins KI, Greenberger LM: Functional evidence that transmembrane 12 and the loop between transmembrane 11 and 12 form part of the drug-binding domain in P-glycoprotein encoded by MDR1. The Journal of biological chemistry 270:5441-8, 1995

179. Zhang JT, Lee CH, Duthie M, et al: Topological determinants of internal transmembrane segments in P-glycoprotein sequences. The Journal of biological chemistry 270:1742-6, 1995

180. Kerr ID: Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. Biochimica et biophysica acta 1561:47-64, 2002

181. Aller SG, Yu J, Ward A, et al: Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science 323:1718-22, 2009

182. Kerr ID, Jones PM, George AM: Multidrug efflux pumps: the structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. FEBS J 277:550-63, 2010

183. Higgins CF, Gottesman MM: Is the multidrug transporter a flippase? Trends in biochemical sciences 17:18-21, 1992

184. Senior AE, Bhagat S: P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. Biochemistry 37:831-6, 1998

185. Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, et al: Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. Cancer research 48:1926-9, 1988

186. Croop JM, Raymond M, Haber D, et al: The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. Molecular and cellular biology 9:1346-50, 1989

187. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86:695-8, 1989

188. Schinkel AH, Mol CA, Wagenaar E, et al: Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. European journal of cancer 31A:1295-8, 1995

189. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, et al: P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. The Journal of clinical investigation 97:2517-24, 1996

190. Saito T, Zhang ZJ, Tsuzuki H, et al: Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with special reference to blood-inner ear barrier. Brain research 767:388-92, 1997

191. Saito T, Zhang ZJ, Ohtsubo T, et al: Inhibitory effect of cyclosporin A on p-glycoprotein function in peripheral nerves of mice treated with doxorubicin and vinblastine. Acta oto-laryngologica 124:313-7, 2004

192. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, et al: Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 38:1277-87, 1990

193. Lu D, Shi HC, Wang ZX, et al: Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. British journal of biomedical science 68:69-74, 2011

194. Sekiya S, Nunoyama T, Shirasawa H, et al: Expression of a human multidrug resistance gene in human ovarian carcinoma cell lines. Archives of gynecology and obstetrics 251:79-86, 1992

195. Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, et al: Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. Cancer science 97:1198-204, 2006

196. Coles LD, Lee IJ, Voulalas PJ, et al: Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). Molecular pharmaceutics 6:1816-25, 2009

197. Kim WY, Benet LZ: P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. Pharmaceutical research 21:1284-93, 2004

198. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, et al: Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. Reproductive toxicology 12:457-63, 1998

199. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, et al: Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:2031-5, 1997

200. van Zuylen L, Verweij J, Nooter K, et al: Role of intestinal P-glycoprotein in the plasma and fecal disposition of docetaxel in humans. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 6:2598-603, 2000

201. del Moral RG, Olmo A, Aguilar M, et al: P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. Experimental nephrology 6:89-97, 1998

202. Nagai J, Takano M: Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs. Expert opinion on drug metabolism & toxicology 6:1125-38, 2010

203. Pahnke J, Wolkenhauer O, Krohn M, et al: Clinico-pathologic function of cerebral ABC transporters - implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Current Alzheimer research 5:396-405, 2008

204. Pal D, Kwatra D, Minocha M, et al: Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. Life sciences 88:959-71, 2011

205. Lee CA, Cook JA, Reyner EL, et al: P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states. Expert opinion on drug metabolism & toxicology 6:603-19, 2010

206. Akhtar N, Ahad A, Khar RK, et al: The emerging role of P-glycoprotein inhibitors in drug delivery: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents 21:561-76, 2011

207. Bernaudin JF, Fajac A, Fleury-Feith J, et al: ABC Proteins and Oncology: Expression, Detection, and Implication of ABC Proteins in Solid Tumors., in Boumrndjel AB, J. Robert, J. (ed): ABC Transporters and Multidrug Resistance, John Wiley & Sons, 2009, pp 143-176

208. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:3473-8, 2000

209. Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al: Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. Clinical pharmacology and therapeutics 70:189-99, 2001

210. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, et al: Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clinical pharmacology and therapeutics 69:169-74, 2001

211. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, et al: MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. Pharmacogenetics 11:217-21, 2001

212. Han JY, Lim HS, Yoo YK, et al: Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer 110:138-47, 2007

213. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al: Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 14:1889-96, 2003

214. Marsh S, Paul J, King CR, et al: Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 25:4528-35, 2007

215. Li YH, Wang YH, Li Y, et al: MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica 33:93-104, 2006

216. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, et al: MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 16:1172-7, 2007

217. Jeannesson E, Albertini L, Siest G, et al: Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. Fundamental & clinical pharmacology 21:411-8, 2007

218. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, et al: The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. Pharmacogenetics 11:293-8, 2001

219. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, et al: Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. Lancet 359:30-6, 2002

220. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, et al: Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 297:1137-43, 2001

221. Illmer T, Schuler US, Thiede C, et al: MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. Cancer research 62:4955-62, 2002

222. Cole SP, Deeley RG: Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. Trends in pharmacological sciences 27:438-46, 2006

223. van der Deen M, Timens W, Timmer-Bosscha H, et al: Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed Mrp1/Mdr1a/1b deficient mice. Respiratory research 8:49, 2007

224. Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, et al: Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. The Journal of biological chemistry 265:10073-80, 1990

225. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al: A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:15665-70, 1998

226. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, et al: A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. Cancer research 58:5337-9, 1998

227. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nature medicine 7:1028-34, 2001

228. Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al: Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. Breast cancer research : BCR 5:R1-8, 2003

229. Abbott BL, Colapietro AM, Barnes Y, et al: Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. Blood 100:4594-601, 2002

230. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al: Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 10:7896-902, 2004

231. Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, et al: Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. The Journal of pathology 198:213-9, 2002

232. Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, et al: Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. Japanese journal of cancer research : Gann 92:452-8, 2001

233. Faneyte IF, Kristel PM, Maliepaard M, et al: Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 8:1068-74, 2002

234. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, et al: Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:1940-9, 2006

235. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, et al: Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 18:1927-34, 2007

236. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, et al: International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 21:2600-8, 2003

237. AROME: Guidelines, minimal requirements and standard of cancer care around the Mediterranean Area: report from the Collaborative AROME (Association of

Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean Area) working parties. Critical reviews in oncology/hematology 78:1-16, 2011

238. Chia YH, Ellis MJ, Ma CX: Neoadjuvant endocrine therapy in primary breast cancer: indications and use as a research tool. British journal of cancer 103:759-64, 2010

239. Ceugnart L, Coudert B, Dalenc F, et al: RPC St Paul de Vence Les traitements néoadjuvants (hors cancer du sein inflammatoire)
. Oncologie, 2011

240. Dawood S, Merajver SD, Viens P, et al: International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 22:515-23, 2011

241. Costa SD, Loibl S, Kaufmann M, et al: Neoadjuvant chemotherapy shows similar response in patients with inflammatory or locally advanced breast cancer when compared with operable breast cancer: a secondary analysis of the GeparTrio trial data. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:83-91, 2010

242. Rouzier R, Pusztai L, Delaloge S, et al: Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23:8331-9, 2005

243. Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, et al: Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors. Cancer 101:918-25, 2004

244. Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, et al: Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 5:3357-63, 1999

245. Mamounas EP: Tailoring loco-regional therapy with neoadjuvant chemotherapy: another step in the right direction. Annals of surgical oncology 11:888-91, 2004

246. Smith IE, Kotsori A: Designing adjuvant treatment based on biological measurements in the neoadjuvant setting. Breast cancer research : BCR 12 Suppl 4:S16, 2010

247. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, et al: Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 26:814-9, 2008

248. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al: Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 16:2672-85, 1998

249. Fisher ER, Wang J, Bryant J, et al: Pathobiology of preoperative chemotherapy: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18. Cancer 95:681-95, 2002

250. Jacquillat C, Baillet F, Auclerc G, et al: Neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. Drugs under experimental and clinical research 12:147-52, 1986

251. Jacquillat C, Baillet F, Auclerc G, et al: [Breast cancer: chemotherapy preceding locoregional treatment with extension of the indications for conservative treatment]. Bulletin du cancer 71:354-60, 1984

252. Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, et al: Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. CA: a cancer journal for clinicians 45:227-43, 1995

253. Mauriac L, MacGrogan G, Avril A, et al: Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomized trial with a 124-month median follow-up. Institut Bergonie Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 10:47-52, 1999

254. Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al: Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 15:2483-93, 1997

255. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP: Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. Journal of the National Cancer Institute 97:188-94, 2005

256. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ: Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. The British journal of surgery 94:1189-200, 2007

257. Scholl SM, Fourquet A, Asselain B, et al: Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumours considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomised trial: S6. European journal of cancer 30A:645-52, 1994

258. Makris A, Powles TJ, Ashley SE, et al: A reduction in the requirements for mastectomy in a randomized trial of neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 9:1179-84, 1998

259. Fisher B: From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century. European journal of cancer 35:1963-73, 1999

260. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, et al: Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 19:4224-37, 2001

261. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, et al: Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:2474-81, 2009

262. Pierga JY, Mouret E, Laurence V, et al: Prognostic factors for survival after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. the role of clinical response. European journal of cancer 39:1089-96, 2003

263. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, et al: Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. Journal of the American College of Surgeons 180:297-306, 1995

264. Rastogi P, Buyse ME, Swain SM, et al: Concurrent bevacizumab with a sequential regimen of doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and capecitabine as neoadjuvant therapy for HER2- locally advanced breast cancer: a phase II trial of the NSABP Foundation Research Group. Clinical breast cancer 11:228-34, 2011

265. Kuerer HM, Buzdar AU, Mittendorf EA, et al: Biologic and immunologic effects of preoperative trastuzumab for ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer 117:39-47, 2011

266. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, et al: Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. American journal of clinical oncology 16:223-8, 1993

267. Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS, et al: Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. British journal of cancer 77:621-6, 1998

268. Rouzier R, Pusztai L, Garbay JR, et al: Development and validation of nomograms for predicting residual tumor size and the probability of successful conservative surgery with neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Cancer 107:1459-66, 2006

269. Gianni L, Zambetti M, Clark K, et al: Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23:7265-77, 2005

270. Heys SD, Hutcheon AW, Sarkar TK, et al: Neoadjuvant docetaxel in breast cancer: 3-year survival results from the Aberdeen trial. Clinical breast cancer 3 Suppl 2:S69-74, 2002

271. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, et al: Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 20:1456-66, 2002

272. von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, et al: Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial. Journal of the National Cancer Institute 100:542-51, 2008

273. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al: Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23:3676-85, 2005

274. Untch M, Loibl S, Bischoff J, et al: Lapatinib vs trastuzumab in Combination with Neoadjuvant Anthracycline-Taxane-Based CHEMOTHERAPY: Primary Efficacy Endpoint Analysis of The GEPARQUINTO study (GBG 44) Breast cancer research and treatment SABCS suppl Abs S3-1, 2010

275. Bozovic-Spasojevic I, Azim HA, Jr., Paesmans M, et al: Neoadjuvant anthracycline and trastuzumab for breast cancer: is concurrent treatment safe? The lancet oncology 12:209-11, 2011

276. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 26:1275-81, 2008

277. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al: Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 29:3351-7, 2011

278. Bear HD: Reaping the harvest from neoadjuvant therapy for breast cancer: reducing morbidity with sentinel lymph node biopsy. Journal of surgical oncology 95:527-9, 2007

279. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al: Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-

27. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 26:778-85, 2008

280. Hutcheon AW, Heys SD, Sarkar TK: Neoadjuvant docetaxel in locally advanced breast cancer. Breast cancer research and treatment 79 Suppl 1:S19-24, 2003

281. Buzdar AU, Singletary SE, Theriault RL, et al: Prospective evaluation of paclitaxel versus combination chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 17:3412-7, 1999

282. Frasci G, D'Aiuto G, Comella P, et al: Preoperative weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel (PET) improves prognosis in locally advanced breast cancer patients: an update of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG) randomised trial 9908. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 21:707-16, 2010

283. Frasci G, D'Aiuto G, Comella P, et al: Weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel with granulocyte colony-stimulating factor support vs triweekly epirubicin and paclitaxel in locally advanced breast cancer: final analysis of a sicog phase III study. British journal of cancer 95:1005-12, 2006

284. Evans TR, Yellowlees A, Foster E, et al: Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23:2988-95, 2005

285. Therasse P, Mauriac L, Welnicka-Jaskiewicz M, et al: Final results of a randomized phase III trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with a dose-intensified epirubicin and cyclophosphamide + filgrastim as neoadjuvant treatment in locally advanced breast cancer: an EORTC-NCIC-SAKK multicenter study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 21:843-50, 2003

286. Untch M, Mobus V, Kuhn W, et al: Intensive dose-dense compared with conventionally scheduled preoperative chemotherapy for high-risk primary breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:2938-45, 2009

287. Smith IE, A'Hern RP, Coombes GA, et al: A novel continuous infusional 5-fluorouracil-based chemotherapy regimen compared with conventional chemotherapy in the neo-adjuvant treatment of early breast cancer: 5 year results of the TOPIC trial. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 15:751-8, 2004

288. Jackisch C, von Minckwitz G, Eidtmann H, et al: Dose-dense biweekly doxorubicin/docetaxel versus sequential neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin/cyclophosphamide/docetaxel in operable breast cancer: second interim analysis. Clinical breast cancer 3:276-80, 2002

289. von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, et al: Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. Journal of the National Cancer Institute 100:552-62, 2008

290. von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S, et al: Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:2015-23, 2010

291. Bear HD: Indications for neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Seminars in oncology 25:3-12, 1998

292. Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, et al: Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13:228-33, 2007

293. Shimizu C, Masuda N, Yoshimura K, et al: Long-term outcome and pattern of relapse after neoadjuvant chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive primary breast cancer. Japanese journal of clinical oncology 39:484-90, 2009

294. Pierga JY, Delaloge S, Espie M, et al: A multicenter randomized phase II study of sequential epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel with or without celecoxib or trastuzumab according to HER2 status, as primary chemotherapy for localized invasive breast cancer patients. Breast cancer research and treatment 122:429-37, 2010

295. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al: Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. Lancet 375:377-84, 2010

296. Untch M, Rezai M, Loibl S, et al: Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:2024-31, 2010

297. Guiu S, Liegard M, Favier L, et al: Long-term follow-up of HER2-overexpressing stage II or III breast cancer treated by anthracycline-free neoadjuvant chemotherapy. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 22:321-8, 2011

298. Harris LN, You F, Schnitt SJ, et al: Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13:1198-207, 2007

299. Wildiers H, Neven P, Christiaens MR, et al: Neoadjuvant capecitabine and docetaxel (plus trastuzumab): an effective non-anthracycline-based chemotherapy regimen for patients with locally advanced breast cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 22:588-94, 2011

300. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al: First Results of the NeoALTTO Trial (BIG 01-06 / EGF 106903): A Phase III, Randomized, Open Label, Neoadjuvant Study of Lapatinib, Trastuzumab, and Their Combination Plus Paclitaxel in Women with HER2-Positive Primary Breast Cancer. Breast cancer research and treatment SABCS suppl Abs S3-3, 2010

301. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, et al: Neoadjuvant Pertuzumab (P) and Trastuzumab (H): Antitumor and Safety Analysis of a Randomized Phase II Study ('NeoSphere'). Breast cancer research and treatment SABCS suppl Abs S3-2, 2010

302. Muller C, Caputo A, Schumacher M, et al: Clinical response by palpation during primary systemic therapy with four dose-dense cycles doxorubicin and docetaxel in patients with operable breast cancer: further results from a randomised controlled trial. European journal of cancer 43:1654-61, 2007

303. Beresford M, Padhani AR, Goh V, et al: Imaging breast cancer response during neoadjuvant systemic therapy. Expert review of anticancer therapy 5:893-905, 2005

304. Schott AF, Roubidoux MA, Helvie MA, et al: Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. Breast cancer research and treatment 92:231-8, 2005

305. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, et al: Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. European journal of cancer 46:1296-316, 2010

306. Uematsu T, Kasami M, Yuen S: Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: correlation between the baseline MR imaging findings and responses to therapy. European radiology 20:2315-22, 2010

307. Cheung YC, Chen SC, Su MY, et al: Monitoring the size and response of locally advanced breast cancers to neoadjuvant chemotherapy (weekly paclitaxel and epirubicin) with serial enhanced MRI. Breast cancer research and treatment 78:51-8, 2003

308. Partridge SC, Vanantwerp RK, Doot RK, et al: Association between serial dynamic contrast-enhanced MRI and dynamic 18F-FDG PET measures in patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. Journal of magnetic resonance imaging : JMRI 32:1124-31, 2010

309. Loo CE, Teertstra HJ, Rodenhuis S, et al: Dynamic contrast-enhanced MRI for prediction of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: initial results. AJR. American journal of roentgenology 191:1331-8, 2008

310. Gilles R, Guinebretiere JM, Toussaint C, et al: Locally advanced breast cancer: contrast-enhanced subtraction MR imaging of response to preoperative chemotherapy. Radiology 191:633-8, 1994

311. Woodhams R, Kakita S, Hata H, et al: Identification of residual breast carcinoma following neoadjuvant chemotherapy: diffusion-weighted imaging--comparison with contrast-enhanced MR imaging and pathologic findings. Radiology 254:357-66, 2010

312. Nilsen L, Fangberget A, Geier O, et al: Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for pretreatment prediction and monitoring of treatment response of patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. Acta oncologica 49:354-60, 2010

313. Koolen BB, Vrancken Peeters MJ, Aukema TS, et al: 18F-FDG PET/CT as a staging procedure in primary stage II and III breast cancer: comparison with conventional imaging techniques. Breast cancer research and treatment, 2011

314. Kolesnikov-Gauthier H, Vanlemmens L, Baranzelli MC, et al: Predictive value of neoadjuvant chemotherapy failure in breast cancer using FDG-PET after the first course. Breast cancer research and treatment, 2011

315. Groheux D, Giacchetti S, Espie M, et al: Early monitoring of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer with 18F-FDG PET/CT: defining a clinical aim. European journal of nuclear medicine and molecular imaging 38:419-25, 2011

316. Berriolo-Riedinger A, Touzery C, Riedinger JM, et al: [18F]FDG-PET predicts complete pathological response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy. European journal of nuclear medicine and molecular imaging 34:1915-24, 2007

317. Wang Y, Zhang C, Liu J, et al: Is 18F-FDG PET accurate to predict neoadjuvant therapy response in breast cancer? A meta-analysis. Breast cancer research and treatment, 2011

318. Tafra L: Positron Emission Tomography (PET) and Mammography (PEM) for breast cancer: importance to surgeons. Annals of surgical oncology 14:3-13, 2007

319. Park SH, Moon WK, Cho N, et al: Comparison of diffusion-weighted MR imaging and FDG PET/CT to predict pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. European radiology, 2011

320. Groheux D, Giacchetti S, Moretti JL, et al: Correlation of high 18F-FDG uptake to clinical, pathological and biological prognostic factors in breast cancer. European journal of nuclear medicine and molecular imaging 38:426-35, 2011

321. Keam B, Im SA, Koh Y, et al: Early metabolic response using FDG PET/CT and molecular phenotypes of breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. BMC cancer 11:452, 2011

322. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al: Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 11:5678-85, 2005

323. Penault-Llorca F, Cayre A, Bouchet Mishellany F, et al: Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. International journal of oncology 22:1319-25, 2003

324. Rouzier R, Coutant C, Incitti R, et al: [Breast cancer: nomograms to predict pathologic response after preoperative chemotherapy]. Le Journal medical libanais. The Lebanese medical journal 57:89-92, 2009

325. von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, et al: Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. Breast cancer research and treatment 125:145-56, 2011

326. Ratain MJ, Robert J, van der Vijgh WJ: Limited sampling models for doxorubicin pharmacokinetics. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 9:871-6, 1991

327. Bruno R, Hille D, Riva A, et al: Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 16:187-96, 1998

328. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al: Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 22:1736-47, 2011

329. Nabholtz JM, Gligorov J: Taxane therapy for early stage breast cancer. Women's health 2:99-114, 2006

330. Nabholtz JM, Gligorov J: Docetaxel in the treatment of breast cancer: current experience and future prospects. Expert review of anticancer therapy 5:613-33, 2005

331. Jones S, Holmes FA, O'Shaughnessy J, et al: Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:1177-83, 2009

332. Valero V, Forbes J, Pegram MD, et al: Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 29:149-56, 2011

333. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al: Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. The New England journal of medicine 365:1273-83, 2011

334. Jones RL, Smith IE: Neoadjuvant treatment for early-stage breast cancer: opportunities to assess tumour response. The lancet oncology 7:869-74, 2006

335. Johnatty SE, Beesley J, Paul J, et al: ABCB1 (MDR 1) polymorphisms and progression-free survival among women with ovarian cancer following paclitaxel/carboplatin chemotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:5594-601, 2008

336. Campbell LL, Polyak K: Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? Cell cycle 6:2332-8, 2007

337. Yang JY, Ha SA, Yang YS, et al: p-Glycoprotein ABCB5 and YB-1 expression plays a role in increased heterogeneity of breast cancer cells: correlations with cell fusion and doxorubicin resistance. BMC cancer 10:388, 2010

338. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN: Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Advances in experimental medicine and biology 608:1-22, 2007

339. Varna M, Soliman H, Feugeas JP, et al: Changes in allelic imbalances in locally advanced breast cancers after chemotherapy. British journal of cancer 97:1157-64, 2007

340. Duche JC, Urien S, Simon N, et al: Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. Clinical biochemistry 33:197-202, 2000

341. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, et al: Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. Int J Oncol 22:1117-21, 2003

342. George J, Dharanipragada K, Krishnamachari S, et al: A single-nucleotide polymorphism in the MDR1 gene as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Clin Breast Cancer 9:161-5, 2009

343. Tran A, Jullien V, Alexandre J, et al: Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1, and GST polymorphisms. Clinical pharmacology and therapeutics 79:570-80, 2006

344. Kim HS, Kim MK, Chung HH, et al: Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. Gynecologic oncology 113:264-9, 2009

345. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ: Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:1291-5, 2008

346. Mir O, Alexandre J, Tran A, et al: Relationship between GSTP1 Ile(105)Val polymorphism and docetaxel-induced peripheral neuropathy: clinical evidence of a role of oxidative stress in taxane toxicity. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 20:736-40, 2009

347. Sissung TM, Baum CE, Deeken J, et al: ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:4543-9, 2008

348. Narita S, Tsuchiya N, Yuasa T, et al: Outcome, clinical prognostic factors and genetic predictors of adverse reactions of intermittent combination chemotherapy with docetaxel, estramustine phosphate and carboplatin for castration-resistant

prostate cancer. International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology, 2011

349. Chew SC, Singh O, Chen X, et al: The effects of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, ABCC2, ABCG2 and SLCO1B3 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel in nasopharyngeal carcinoma patients. Cancer chemotherapy and pharmacology 67:1471-8, 2011

350. Pan JH, Han JX, Wu JM, et al: MDR1 single nucleotide polymorphism G2677T/A and haplotype are correlated with response to docetaxel-cisplatin chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. Respiration; international review of thoracic diseases 78:49-55, 2009

351. Shitara K, Matsuo K, Ito S, et al: Effects of genetic polymorphisms in the ABCB1 gene on clinical outcomes in patients with gastric cancer treated by second-line chemotherapy. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 11:447-52, 2010

352. Tsai SM, Lin CY, Wu SH, et al: Side effects after docetaxel treatment in Taiwanese breast cancer patients with CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 gene polymorphisms. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 404:160-5, 2009

353. Fajac A, Gligorov J, Rezai K, et al: Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients. British journal of cancer 103:560-6, 2010

354. Rizzo R, Spaggiari F, Indelli M, et al: Association of CYP1B1 with hypersensitivity induced by taxane therapy in breast cancer patients. Breast cancer research and treatment 124:593-8, 2010

355. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, et al: Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. Pharmacogenet Genomics 18:263-73, 2008

356. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, et al: MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. Pharmacogenomics J 10:62-9, 2010

357. Fajac A, Gligorov J, Rezai K, et al: Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients. Br J Cancer 103:560-6, 2010

358. Nordgard SH, Ritchie MD, Jensrud SD, et al: ABCB1 and GST polymorphisms associated with TP53 status in breast cancer. Pharmacogenetics and genomics 17:127-36, 2007

359. Ekhart C, Rodenhuis S, Smits PH, et al: An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. Cancer treatment reviews 35:18-31, 2009

360. Harvey V, Mouridsen H, Semiglazov V, et al: Phase III trial comparing three doses of docetaxel for second-line treatment of advanced breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:4963-70, 2006

361. Wang D, Johnson AD, Papp AC, et al: Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. Pharmacogenetics and genomics 15:693-704, 2005

362. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science 315:525-8, 2007

363. Roche H, Fumoleau P, Spielmann M, et al: Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:5664-71, 2006

364. Franke RM, Carducci MA, Rudek MA, et al: Castration-dependent pharmacokinetics of docetaxel in patients with prostate cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:4562-7, 2010

365. Gligorov J, Fajac A, Bernaudin JF: Castration-dependent pharmacokinetics of docetaxel: do sex and/or ABCB1 polymorphism also matter? Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 29:e454-5; author reply e456-7, 2011

366. Hirth J, Watkins PB, Strawderman M, et al: The effect of an individual's cytochrome CYP3A4 activity on docetaxel clearance. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 6:1255-8, 2000

367. van Waterschoot RA, Lagas JS, Wagenaar E, et al: Individual and combined roles of CYP3A, p-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) in the pharmacokinetics of docetaxel. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2010

368. Aouali N, Eddabra L, Macadre J, et al: Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. Critical reviews in oncology/hematology 56:61-70, 2005

369. Zhang H, Jiang H, Wang X, et al: Reversion of multidrug resistance in tumor by biocompatible nanomaterials. Mini reviews in medicinal chemistry 10:737-45, 2010

370. Goldie JH, Coldman AJ: A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. Cancer treatment reports 63:1727-33, 1979

371. Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, et al: Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. Nature 483:570-5, 2012

Dans le cancer du sein non métastatique, l'approche néoadjuvante permet d'étudier les paramètres liés à la tumeur et/ou à l'hôte influençant l'efficacité des traitements. Les protéines de la famille MDR et plus particulièrement ABCB1 sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux anthracyclines et taxanes. Les corrélations entre efficacité (réponse histologique), polymorphisme d'ABCB1 (patientes et tumeurs) et pharmacocinétique de la doxorubicine et du docétaxel ont été étudiées dans le cadre d'un essai thérapeutique. Dans cette étude, le polymorphisme de l'exon 26 d'ABCB1 (rs1045642) est le seul qui influence la pharmacocinétique du docétaxel et ceci uniquement chez les patientes non ménopausées. Les patientes porteuses du génotype CC (40%) ont une valeur moyenne de l'AUC du docétaxel statistiquement inférieure à celles porteuses des génotypes CT (45%) et TT (15%) (p<0.0001). Par ailleurs il a été constaté chez les patientes non ménopausées une corrélation statistiquement significative entre des taux d'AUC bas du docétaxel et le diplotype 2677GG-3435CC ainsi que l'haplotype 61AA-1236CC-2677GG-3435CC. Il n'a pas été trouvé de lien entre les différents polymorphismes d'ABCB1 et la pharmacocinétique de la doxorubicine. Il existe par ailleurs une relation négative entre l'AUC du docétaxel et l'obtention d'une réponse complète histologique. Il semble exister donc une valeur minimale d'AUC du docétaxel afin d'obtenir une réponse. Par ailleurs, nous avons retrouvé un lien entre réponse tumorale et le polymorphisme d'ABCB1 (génotype C3435T, TT vs CT et CC). Cette approche pharmacogénomique a pour objectif l'amélioration de la prise en charge personnalisée du cancer du sein par docetaxel.

In non-metastatic breast cancer, neoadjuvant treatment allows to study the parameters influencing their effectiveness, related to the tumor and / or the host. The MDR family proteins, especially ABCB1 are involved in the mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes. The correlations between efficiency (histological response), ABCB1 polymorphism (patients and tumors) and pharmacokinetics of doxorubicin and docetaxel have been studied in the context of a therapeutic trial. In this study, polymorphism in exon 26 of ABCB1 (rs1045642) is the only that influences the pharmacokinetics of docetaxel and this only in premenopausal patients. Patients carrying CC genotype (40%) have an average value of the AUC of docetaxel significantly lower than those carrying genotypes CT (45%) and TT (15%) (p <0.0001). Moreover it was found in premenopausal patients a statistically significant correlation between low rates of docetaxel AUC and diplotype 2677GG-3435CC and 1236CC haplotype-61AA-2677GG-3435CC. It has not been found a link between ABCB1 polymorphisms and the pharmacokinetics of doxorubicin. There is also a negative relationship between AUC of docetaxel and pathological response. There seems therefore that a minimum value of AUC of docetaxel is necessary to obtain a response. Furthermore, we found an association between tumor response and polymorphism of ABCB1 (C3435T genotype, CT and TT vs. CC). The goal of this pharmacogenomic approach iis to improve personalized breast cancer care with docetaxel.