

Année universitaire 2012-2013

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

COURCAULT Elise

n e le 29 décembre 1986 à Angers (49)

soutenue publiquement le 17 Décembre 2012

Prévention des effets secondaires de l'oxaliplatine
par une approche pharmacogénétique

JURY

Président : Pr Yves MAURAS
Directeur : Dr Michèle BOISDRON-CELLE
Membres : Dr Olivier CAPITAIN
Mme Anne-Lise SEPTANS



THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

COURCAULT Elise

née le 29 décembre 1986 à Angers (49)

soutenue publiquement le 17 Décembre 2012

Prévention des effets secondaires de l'oxaliplatine
par une approche pharmacogénétique

JURY

Président : Pr Yves MAURAS
Directeur : Dr Michèle BOISDRON-CELLE
Membres : Dr Olivier CAPITAIN
Mme Anne-Lise SEPTANS

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée, **Elise COURCAULT**, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Elise Courcault

Liste des enseignants

Année Universitaire 2012-2013

PROFESSEURS

	<i>Disciplines</i>
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie
BOUET Gilles	Chimie Physique Générale et Minérale
BOURY Franck	Biophysique
CALENDA Alphonse	Biologie Moléculaire - Biotechnologie
DUVAL Olivier	Chimie Thérapeutique
FOUSSARD Françoise	Biochimie Générale et Clinique
JARDEL Alain	Physiologie
MAHAZA Chetaou	Bactériologie - Virologie
MARCHAIS Véronique	Bactériologie et Virologie
MAURAS Geneviève	Biologie Cellulaire
MAURAS Yves	Toxicologie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale – Chimie analytique
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie
ROBERT Raymond	Parasitologie et Mycologie médicale
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
SERAPHIN Denis	Chimie Organique
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie

MAITRES DE CONFERENCES

	<i>Disciplines</i>
ANNAIX Véronique	Biochimie Générale et Clinique
BASTIAT Guillaume	Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
BAGLIN Isabelle	Pharmaco - Chimie
BATAILLE Nelly	Biologie Cellulaire et Moléculaire
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et Pharmacocinétique
CLÈRE Nicolas	Pharmacologie
CORVEZ Pol	Sémiologie
DERBRE Séverine	Pharmacognosie

MAITRES DE CONFERENCES

DUBREUIL Véronique
ÉVEILLARD Matthieu
FAURE Sébastien
FLEURY Maxime
GALLAND Françoise
GIRAUD Sandrine
GUILLET David
HELESBEUX Jean-Jacques
JOLIVET Jean-Paul
KHAN Mustayeen
LAGARCE Frédéric
LANDREAU Anne
LARCHER Gérald
LE RAY Anne-Marie
LICZNAR Patricia
MALLET Marie-Sabine
MAROT Agnès
MILTGEN-LANCELOT Caroline

NAIL BILLAUD Sandrine
OGER Jean-Michel
PECH Brigitte
SCHINKOVITZ Andréas
TRICAUD Anne

Disciplines

Chimie Analytique
Bactériologie - Virologie
Pharmacologie Physiologie
Immunologie
Biophysique
Biologie moléculaire et cellulaire
Chimie Analytique
Chimie Organique
Biophysique
Chimie Générale et Minérale
Pharmacotechnie-Biopharmacie
Botanique
Biochimie Générale et Clinique
Valorisation des substances naturelles
Bactériologie - Virologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Parasitologie et Mycologie médicale
Management et gestion des organisations
de santé
Immunologie
Chimie
Pharmacotechnie
Pharmacognosie
Biologie Cellulaire

A.H.U.

SPIESSER-ROBELET Laurence

Disciplines

Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

PRAG (Professeurs Agrégés)

HANOTTE Caroline
ROUX Martine

Disciplines

Economie – Gestion
Espagnol

**PRCE (Professeurs certifiés affectés dans
l'enseignement supérieur)**

GENARD Nicole
LECOMTE Stéphane

Anglais
Anglais

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Yves Mauras,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je vous remercie de votre disponibilité et de vos conseils lors de l'élaboration de ce travail.

Soyez assuré de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Michèle Boisdron-Celle,

Vous m'avez accueillie dans votre service et m'avez fait partager vos travaux de recherches. Travailler à vos côtés fut très enrichissant et m'a apporté une vision très humaine de mon rôle de pharmacien. Je vous remercie particulièrement de votre gentillesse, votre écoute, vos précieux conseils dans l'écriture de ce manuscrit, ainsi que la passion avec laquelle vous transmettez votre savoir et vos convictions.

Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de mon grand respect.

A Monsieur le Docteur Olivier Capitain,

Vous me faites l'honneur d'être membre du jury de ma thèse. Il est très enrichissant pour moi de partager ce travail avec vous, qui avez-vous-même étudié le sujet.

Je vous en remercie vivement.

A Madame Anne-Lise Septans,

Vous m'avez accompagnée tout au long de mon travail, avec une grande disponibilité, malgré les nombreux travaux dont vous êtes en charge. Votre gentillesse et votre patience, à chacune de mes requêtes, furent très précieuses. Vous avez de plus accepté d'être membre de ce jury.

Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

A toute l'équipe du Laboratoire d'Oncopharmacologie:

Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, et votre grande disponibilité tout au long de mon expérience à l'ICO Paul Papin.

Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

A ma très chère « promo 2007 »,

Avec qui j'ai partagé les meilleurs moments étudiants, dans la joie et surtout la bonne humeur ! Nous commençons désormais notre Tour de France (et Tour du Monde !) pour conserver cette précieuse amitié, malgré le début de nos vies respectives.

Vous êtes parfaits. Mention spéciale à Eve-Anne et Matthieu, particulièrement parfaits.

A mes amis angevins,

Pour tous ces moments qui furent exceptionnels, joyeux, et le plus souvent ressourçant. Sans jugement mais avec compréhension, vous m'avez toujours encouragée dans mes études. Vivement les futurs Week-End, voyages et autres, en tant que personne de la vie active. Enfin !

A Thomas, Julie, Marion, Fabien et Théo,

Parce que la famille c'est précieux ! Merci pour votre vision « hors pharmacie », qui m'a apporté, j'en suis sûre, une sensibilité et une humanité dans les fonctions que j'occupe aujourd'hui. Merci pour vos encouragements sans relâche, dès ma première année, ainsi que tous les moments de bonheur partagés ensemble. Vivement la suite...

A mes parents,

Ces quelques mots ne seront bien sûr pas suffisant... Un grand merci pour votre soutien sans faille, dans toutes mes démarches entreprises, en France ou ailleurs. La fierté que vous avez de moi est ma plus belle récompense !

Soyez assurés que cette soutenance est le point final de mes études. Vous êtes désormais libres !

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	9
L'oxaliplatine.....	9
• <i>Structure physico-chimique</i>	9
• <i>Métabolisme de l'oxaliplatine</i>	10
• <i>Mécanisme d'action de l'oxaliplatine</i>	10
• <i>Administration de l'oxaliplatine</i>	12
• <i>Pharmacocinétique de l'oxaliplatine</i>	13
• <i>Effets indésirables de l'oxaliplatine</i>	13
• <i>Prévention de la neuropathie périphérique de l'oxaliplatine</i>	14
• <i>Mécanisme de toxicité de l'oxalate</i>	16
Le cancer colorectal.....	20
• <i>Généralités</i>	20
• <i>Histoire de la maladie</i>	20
• <i>Diagnostic de la maladie</i>	22
• <i>Le dépistage de la maladie</i>	22
• <i>Prise en charge thérapeutique</i>	23
• <i>Suivi du patient</i>	26
La pharmacogénétique.....	27
• <i>Généralités</i>	27
• <i>Ses applications et sa portée</i>	28
• <i>Le théranostique</i>	29
• <i>Exemple d'un outil de théranostique</i>	29
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	32
PATIENTS, MATERIEL ET METHODE.....	33
Patients	33
• <i>Critères d'inclusion et non inclusion</i>	33
• <i>Traitement administré</i>	34
Matériel.....	34
• <i>Matériel nécessaire au dépistage des mutations</i>	35
• <i>Matériel nécessaire à l'évaluation de la neurotoxicité aiguë</i>	36
Méthode.....	36
• <i>Amplification par Polymérisation en chaîne (PCR)</i>	36
• <i>Mini-séquençage luminométrique</i>	37
• <i>Evaluation de la neurotoxicité aiguë</i>	40
• <i>Analyse statistique</i>	42
RESULTATS	43
Description de la population.....	43
Neurotoxicités recensées lors de l'étude.....	43
• <i>Réduction de dose et report de cure pour neurotoxicités aiguës</i>	44
Description des polymorphismes génétiques au sein de la population étudiée.....	45
• <i>Amplification des ADN génomiques</i>	45
• <i>Séquençage de l'ADN par pyroséquençage</i>	46
• <i>Pro11Leu</i>	47
• <i>Ile340Met</i>	48
Corrélation entre polymorphisme génétique et neurotoxicité	48
• <i>Pro11Leu</i>	49
• <i>Ile 340Met</i>	49
DISCUSSION.....	50
Points forts de l'étude	50
Défauts de l'étude	51
Point sur la littérature.....	52
Nouveaux axes de recherche	53
Précautions d'utilisation de la pharmacogénétique.....	55
CONCLUSION	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
ANNEXES	61

INTRODUCTION

L'oxaliplatine

- *Structure physico-chimique*

Le platine est un métal de transition qui présente deux états d'oxydation : +II et +IV. Il est principalement retrouvé sous la forme oxydée +II dans les dérivés du platine utilisés en cancérologie. Si les propriétés antitumorales des dérivés du platine furent découvertes dès 1965, ils font partie encore aujourd'hui des antinéoplasiques les plus efficaces et les plus utilisés en thérapeutique. Trois générations de complexes de dérivés du platine peuvent être distinguées : le cisplatine fut le premier utilisé, suivi par le carboplatine, puis l'oxaliplatine, ou 1,2-diaminocyclohexane trans-1-oxaliplatinum (*Tableau 1*).

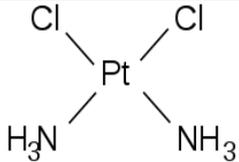
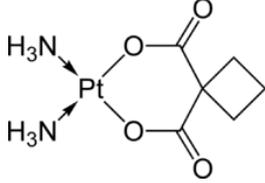
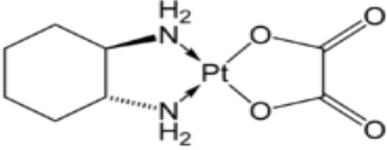
Génération	Nom de la molécule	Molécule
1 ^e génération	Cisplatine <i>Cis-diamminedichloroplatine</i>	
2 ^e génération	Carboplatine	
3 ^e génération	Oxaliplatine <i>1,2-diaminocyclohexane trans-1-oxaliplatinum</i>	

Tableau 1 - Présentation des générations de dérivés du platine (Nuhrich 2008)

Malgré l'évolution au fil des générations, la structure de base est conservée : la molécule est plane, carrée et centrée sur un atome de platine à l'état d'oxydation +II, lui-même lié par des liaisons covalentes à quatre ligands, de deux types :

- des ligands azotés, non labiles, dit « transporteurs » qui donneront le diaminocyclohexane (DACH) ;
- des ligands hydrolysables, labiles, de nature anionique, échangeables par divers nucléophiles.

- **Métabolisme de l'oxaliplatine**

En thérapeutique, les complexes de platine deviennent rapidement, dans les secteurs biologiques, des composés électrophiles (*Figure 1*). L'oxaliplatine peut ainsi alkyliser l'ADN, les phospholipides membranaires, le cytosquelette, l'ARN, l'ADN mitochondrial ainsi que les groupements thiols cellulaires.

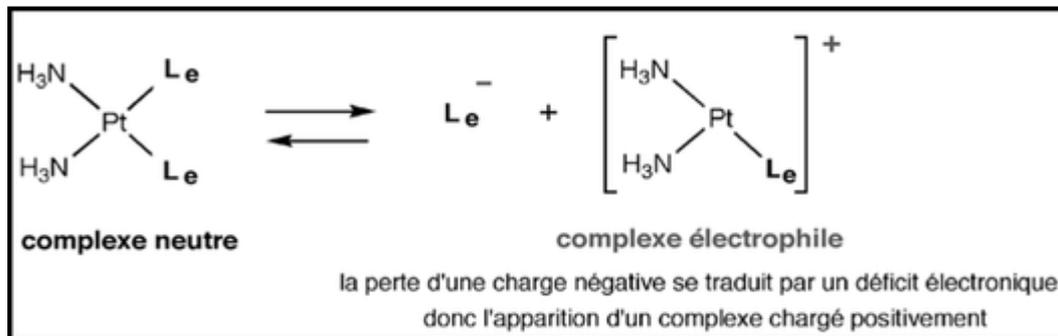


Figure 1 - Illustration de la propriété électrophile des dérivés du platine (Nuhrich 2008)

Ce nouveau complexe formé va présenter une forte affinité avec des groupements nucléophiles tels que des molécules d'eau et des atomes de chlore, très présents dans l'organisme. A la différence du carboplatine et du cisplatine, l'oxaliplatine présente un encombrement stérique plus important, limitant ainsi ses réactions avec les espèces nucléophiles. Cependant, des réactions de biotransformations ont tout de même lieu, conduisant à la formation de métabolites actifs cytotoxiques tels que :

- PtCl₂(DACH)
- PtCl(OH)(DACH)
- Pt(OH)₂(DACH)

En plus de ces espèces, le métabolisme de l'oxaliplatine conduit à la libération d'oxalate, de conjugués inactifs, et de DACH libre. Les produits formés à partir des complexes de l'oxaliplatine auront chacun un rôle spécifique. Certains seront liés à un phénomène d'activation (action anti-tumorale, effets secondaires), d'autres à un phénomène d'inhibition (détoxification, résistance).

- **Mécanisme d'action de l'oxaliplatine**

Le mécanisme d'action de l'oxaliplatine se déroule en quatre grandes étapes. Dans un premier temps, après avoir été administré, l'oxaliplatine diffuse dans les compartiments sanguins et plasmatiques et le complexe est bioactivé (*Figure 2*).

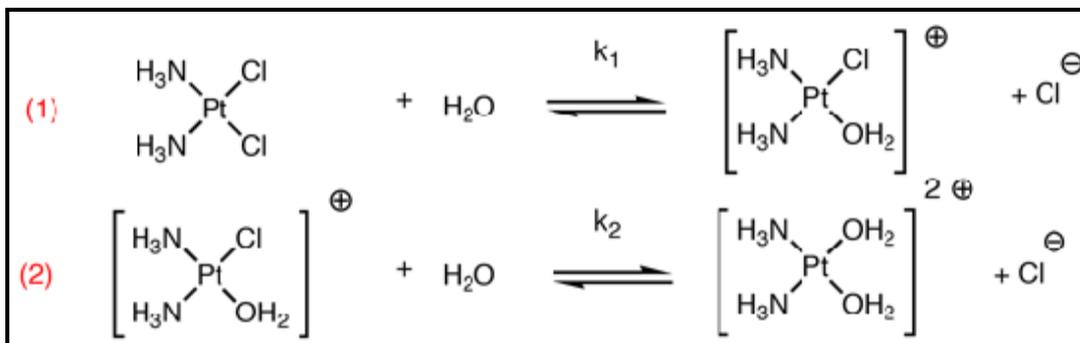


Figure 2 - Comportement des dérivés du platine dans les différents compartiments humains (Nuhrich 2008)

Plutôt stable en milieu sanguin, le complexe subit ensuite quelques transformations dans le compartiment plasmatique. L'eau est abondante et le chlore est peu présent ; par conséquent le complexe va être hydrolysé et il va donc y avoir une substitution Cl/H₂O. Cette transformation en espèce électrophile très réactive va conditionner sa fixation sur l'ADN. La fixation sur l'ADN se fait par formation d'adduits, mono ou bifonctionnel, entre l'atome de platine et l'ADN (Figure 3).

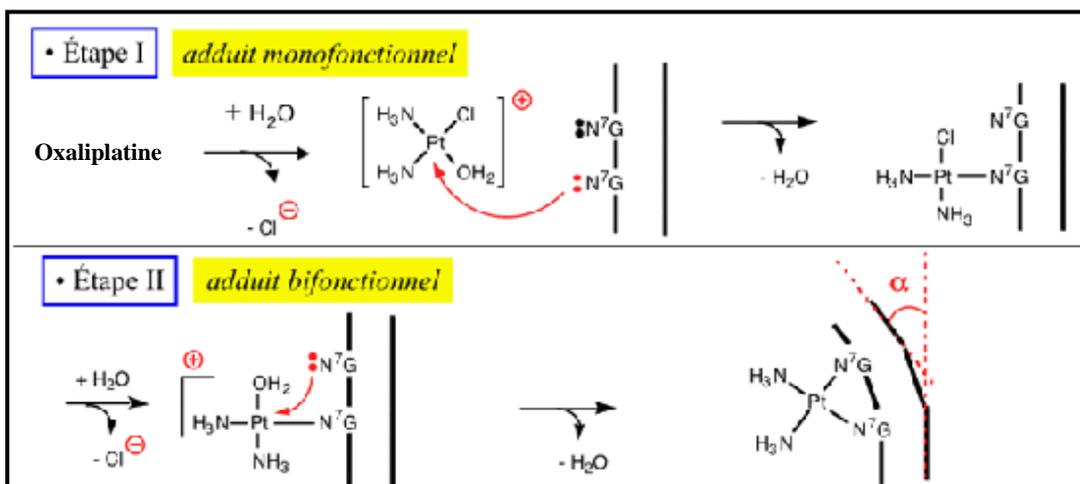


Figure 3 - Mécanisme de formation des adduits entre le dérivé de platine et l'ADN (Nuhrich 2008)

La liaison s'établit à la position N7 de deux guanines adjacentes (GG), d'une adénine et d'une guanine adjacente (AG) ou de guanines séparées par un nucléotide (GNG), empêchant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN, cause des effets cytotoxiques et antinéoplasiques. En effet, ces adduits provoquent une distorsion de la double hélice stoppant les ADN polymérase dans la réplication. Par conséquent, la transcription de l'ADN en ARNm est aussi inhibée.

Il existe deux types d'adduits (Figure 4) entre les dérivés du platine et l'ADN :

- Les adduits intra-brins : les bases azotées liées à l'atome de platine se situent sur le même brin d'ADN.

- Les adduits inter-brins : les bases azotées liées à l'atome de platine sont chacune situées sur un brin différent de l'ADN.

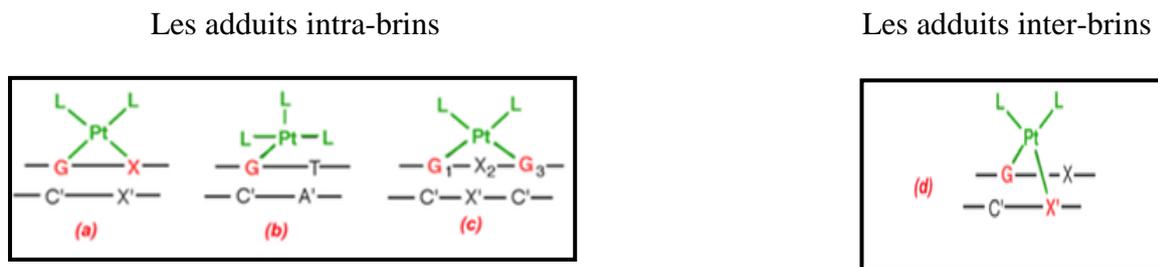


Figure 4 - Illustration des différents types d'adduits entre les dérivés de platine et l'ADN (Nuhrich 2008)

- **Administration de l'oxaliplatine**

L'oxaliplatine se présente sous la forme d'une poudre lyophilisée agglomérée ou non, blanche à blanc-cassé, administrée par perfusion. Dosé à 5mg/mL, ce médicament inscrit sur la liste I, est soumis à prescription hospitalière de spécialistes en oncologie, hématologie ou médecins compétents en cancérologie, et généralement prescrit dans le cadre d'un cancer du colon, du rectum et du pancréas. Le plus souvent administré en association avec le 5 FU, l'oxaliplatine peut parfois être utilisé en monothérapie, dans le cadre de cancers colorectaux métastatiques résistants au 5-FU. L'oxaliplatine est administré chez l'adulte en intraveineuse, à la dose de 85 mg/m² de surface corporelle, toutes les deux semaines. La perfusion est réalisée en 2 à 6 heures, dans 250 à 500ml de glucose à 5%. Toute perfusion d'oxaliplatine doit précéder celle de 5-fluorouracile, et ne doit pas être associée à un autre médicament. Même si le protocole peut varier d'un individu à l'autre, l'oxaliplatine est le plus souvent administré sur une période de 6 mois, soit 12 cycles.

Dans le traitement des cancers colorectaux, le protocole débute par l'administration d'Oxaliplatine (Eloxatine ®) à la dose de 85 mg/m², en perfusion de 2 heures dans 250 ml de solution glucosée à 5%, par une voie veineuse centrale, administrée à J1 puis répétée toutes les deux semaines. L'oxaliplatine est associée au 5FU et à l'acide folinique (AF) (LV5FU2) selon différents protocoles (Figure 5).

Protocole	Oxaliplatine	Leucovorine	5-FU/Capécitabine	Fréquence
FOLFOX 6	100 mg/m ² J1	400 mg/m ² sur 2 h J1	FU 400 mg/m ² bolus J1, suivit par 2400-3000 mg/m ² sur 46 h en perfusion continue	Toutes les 2 semaines
FOLFOX 6 modifié	85 mg/m ² J1	400 mg/m ² sur 2 h J1	FU 400 mg/m ² bolus J1, suivit par 2400 mg/m ² sur 46 h	Toutes les 2 semaines
FOLFOX 7	130 mg/m ² J1	400 mg/m ² sur 2 h J1	FU 400 mg/m ² bolus, puis 2400 mg/m ² sur 46 h	Toutes les 2 semaines

Figure 5 – Exemples de différents protocoles Folfox

- **Pharmacocinétique de l'oxaliplatine**

L'absorption de l'oxaliplatine présente une variabilité interindividuelle significative. Elle est en général maximale au bout de 2 heures de perfusion à la dose de 85 mg/m², et se localise principalement dans le sang, le plasma et l'ultrafiltrat. La distribution de l'oxaliplatine se fait principalement dans les reins et la rate, avec une fixation de haute affinité aux protéines plasmatiques, principalement l'albumine et les gammaglobulines. Une accumulation rapide et irréversible dans les érythrocytes est aussi observée, ce qui explique le pic de concentration splénique (Pendyala *et al*, 1995). La biotransformation de l'oxaliplatine, effectuée à 30% dans le secteur plasmatique, conduit à la formation de dérivés cytotoxiques tels que le monochloro-, le dichloro- et le diaquo-DACH platine, consécutifs à la perte du groupement oxalate qui est remplacé par un ou plusieurs ions chlore. Le DACH-platine ainsi formé représente 70% de l'oxaliplatine qui pénètre dans les cellules. L'oxaliplatine est finalement éliminée de manière triphasique : tout d'abord une phase alpha rapide ($T_{1/2\alpha} = 0,45$ h), puis une phase d'élimination plasmatique lente ($T_{1/2\beta} = 37,52$ h) et enfin une phase terminale très prolongée ($T_{1/2\gamma} = 273$ h). Les concentrations en platine dans les différents secteurs (plasma et érythrocytes) sont analysées avant chaque nouveau cycle et à la fin de chaque perfusion, par l'ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) afin de contrôler son accumulation dans l'organisme.

- **Effets indésirables de l'oxaliplatine**

L'oxaliplatine présente une amélioration en matière de traitement dérivé du platine, principalement par la rareté des alopecies. Cependant, d'autres effets secondaires persistent, mais ils peuvent être anticipés. Les troubles digestifs tels que les nausées et vomissement, par exemple, sont contrôlés par un traitement anti-émétique, antagoniste des récepteurs 5-HT₃. Concernant les risques d'allergie, un faible nombre de cas (<5%) a été rapporté, le plus souvent chez des patients déjà traités par du cisplatine. Un traitement anti-histaminique ou une corticothérapie est administré pour faire disparaître les symptômes. L'arrêt du traitement

est recommandé, sauf indications contraires. De manière assez rare, l'oxaliplatine présente chez certains patients un risque de neutropénie, de thrombopénie et/ou d'anémie. Cet effet indésirable est dose-dépendant, c'est pourquoi une surveillance du patient évitera des conséquences graves. Le risque est plus élevé lors d'association avec le 5-FU.

La réelle limite du traitement par oxaliplatine est sa neurotoxicité, périphérique principalement. Elle s'exprime sous deux formes : l'une précoce, dite aiguë, spécifique de l'oxaliplatine, et l'autre plus tardive, dite chronique, proche des effets du cisplatine. La spécificité de l'atteinte sensitive périphérique est telle qu'une échelle d'évaluation de cette tolérance a été mise au point au cours du développement clinique de l'oxaliplatine (Levi *et al*, 1993). Des équivalences avec une échelle de l'OMS ont ensuite été proposées. La toxicité précoce est décrite par des dysesthésies des extrémités, doigts et orteils, linguales, transitoires, déclenchées ou aggravées par l'exposition au froid. Elle est observée au moins une fois par 80% des patients (Gamelin *et al*, 2004), au cours de la perfusion, sur plusieurs jours. Elles s'étendent souvent plus longtemps au fil des administrations, expliquant le profil dose-dépendant de l'oxaliplatine. Dans certains cas, les manifestations sont plus sévères, telles que :

- des contractures musculaires douloureuses évoquant parfois le signe de Trousseau
- des dysesthésies pharyngo-laryngées pouvant survenir dans les heures ou les premiers jours suivant la perfusion
- un pseudo-laryngospasme, très angoissant, apparaissant de manière précoce et brutale et se traduisant par une raucité de la voix ainsi qu'une sensation de gêne voire d'oppression respiratoire avec dyspnée.

La composante chronique n'est pas aussi spécifique à l'oxaliplatine. Elle est l'évolution d'une toxicité aiguë, apparaissant en moyenne à 6 mois de traitement et s'accompagnant parfois d'une difficulté à la marche, à l'écriture, au laçage des chaussures et au boutonnage des vêtements. Généralement, ces effets s'estompent vers 3 mois après la fin du traitement, se traduisant par un retour à un grade de neurotoxicité ≤ 2 NCI (échelle d'évaluation du National Cancer Institute). La probabilité de récupération est de 82% après 6 mois d'arrêt du traitement et de 88% après 8 mois et demi (Gamelin *et al*, 2004).

- ***Prévention de la neuropathie périphérique de l'oxaliplatine***

Plusieurs travaux de recherche ont été menés afin de mieux comprendre cette toxicité aiguë qui conduit régulièrement à des arrêts de traitement. Au fil des études, les observations ont conduit à établir un rapprochement entre les neuropathies périphériques imputables à l'oxaliplatine et les symptômes parfois observés lors d'une intoxication par éthylène glycol, suite à l'ingestion d'antigel par exemple. En effet, lors d'une ingestion massive, des effets tels que des manifestations rénales, cérébrales mais aussi des troubles neurologiques

périphériques de type polyneuropathies neurosensorielles prédominant aux extrémités sont observés. Or, l'étude de la pharmacocinétique de ces deux substances a permis d'identifier un métabolite commun, l'oxalate (Dumont 2004). Il est libéré lors de la première réaction du métabolisme de l'oxaliplatine ; c'est aussi le produit de transformation de l'acide glycolique, dans le mécanisme de métabolisation de l'éthylène glycol (*Figure 6*).

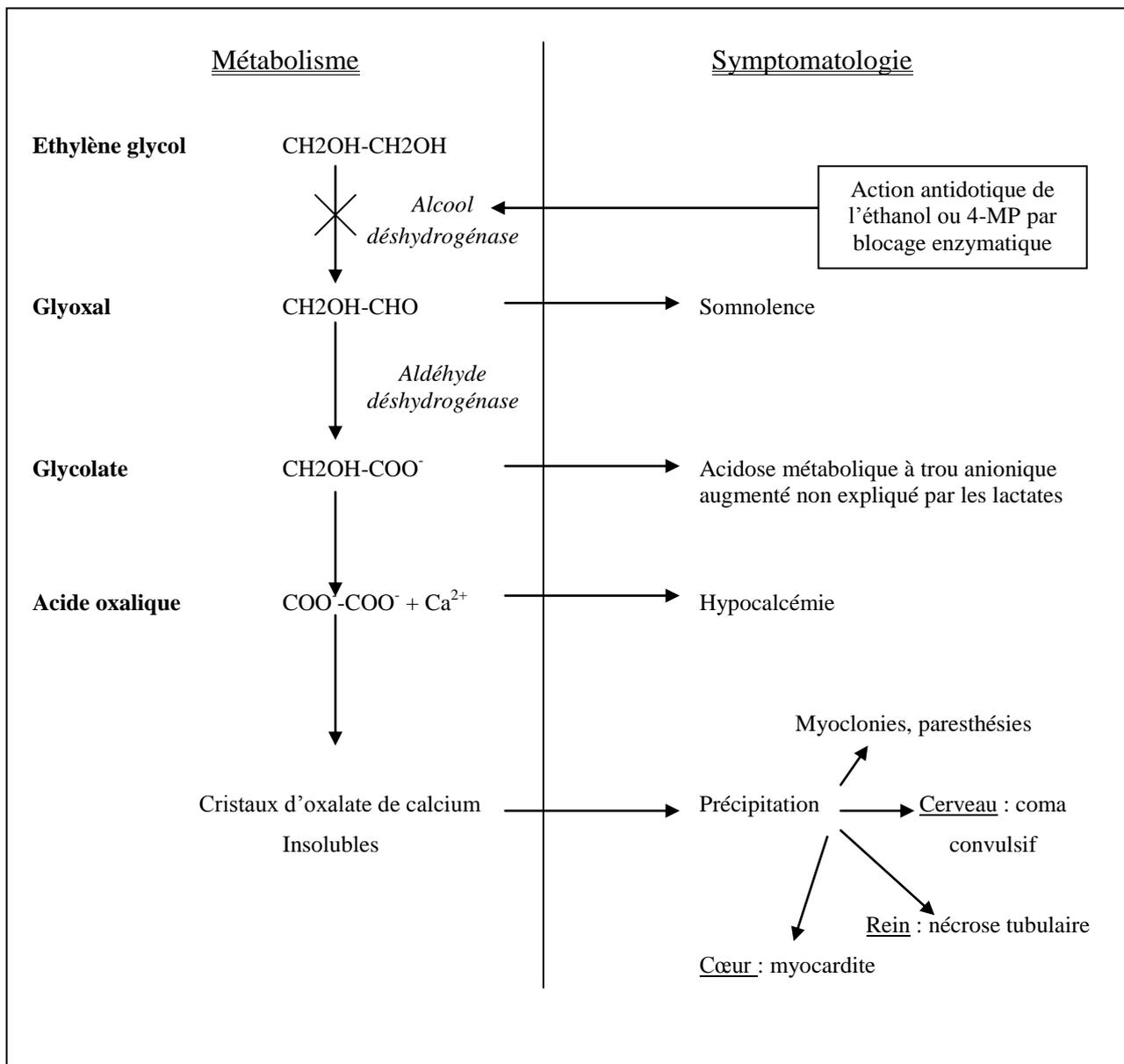


Figure 6 - Métabolisme et toxicité aiguë de l'éthylène glycol (Mégarbane 2003)

De plus, l'oxalate est un fort chélateur de calcium et de magnésium. Il est donc possible que la neurotoxicité aiguë soit provoquée par une inhibition des canaux sodiums calcium dépendants, elle-même liée à une chélation du calcium intracellulaire par l'oxalate (Grolleau et al, 2001). Plusieurs études ont donc été menées afin d'élaborer un protocole de prévention de ces neuropathies. Un essai fut mené à l'ICO Paul Papin, afin de montrer l'intérêt d'administrer des perfusions de calcium et de magnésium lors des traitements par oxaliplatine, limitant au maximum la chélation du calcium et, par suite, les neuropathies

aiguës. Les résultats, concluants, ont conduit au dépôt d'un brevet par l'équipe (Gamelin et al, 2003). D'autres études se sont concentrées sur l'utilisation de molécules dont l'action est de bloquer les canaux sodiums, telles que décrites dans le tableau ci-dessous (*Table 1*).

Molécule	Effet	Etude	Conclusion
<i>Carbamazépine</i>	Blocage efficace des canaux sodiques calcium dépendants	(Lersch, Schmelz, et Eckel 2002)	Impossibilité d'administrer ce médicament à des doses efficaces car il entraîne de graves toxicité
<i>Gabapentine</i>	Antiépileptique bloqueur de canaux sodium	(Lersch et al, 2002) (Wilson, Lehky, et Thomas 2002)	Réduction partielle des neurotoxicités (61%). Des études complémentaires sont nécessaires car l'action n'est peut être pas axée sur les canaux concernés
<i>Venlafaxine</i>	Anti-dépresseur	(Durand, Brezault, et Goldwasser 2003)	Une dose orale de 50 mg avant la perfusion d'oxaliplatine réduirait presque tous les symptômes neurologiques. Cependant seulement peu de patients ont été testés.

Table 1 - Molécules testées afin de limiter les effets secondaires de l'oxaliplatine

Cependant, les résultats de ces tests ne se sont pas avérés aussi concluants, mettant en cause une difficulté d'utilisation de ces molécules en routine, le plus souvent due à de nombreux effets secondaires graves.

- **Mécanisme de toxicité de l'oxalate**
 - **L'hyperoxalurie primitive de type 1**

Il existe deux grandes voies de formation de l'acide oxalique : la voie principale du glyoxylate, et la voie de l'oxydation de l'acide ascorbique où l'oxalate est le produit final. Formé à partir du glycolate, le glyoxylate est normalement converti en glycine par transamination par l'Alanine Glyoxylate Aminotransférase (AGT), au niveau du peroxysome

hépatique. L'activité normale de l'AGT permet de détoxifier 99% du glyoxylate, limitant ainsi fortement la transformation en oxalate (Figure 7).

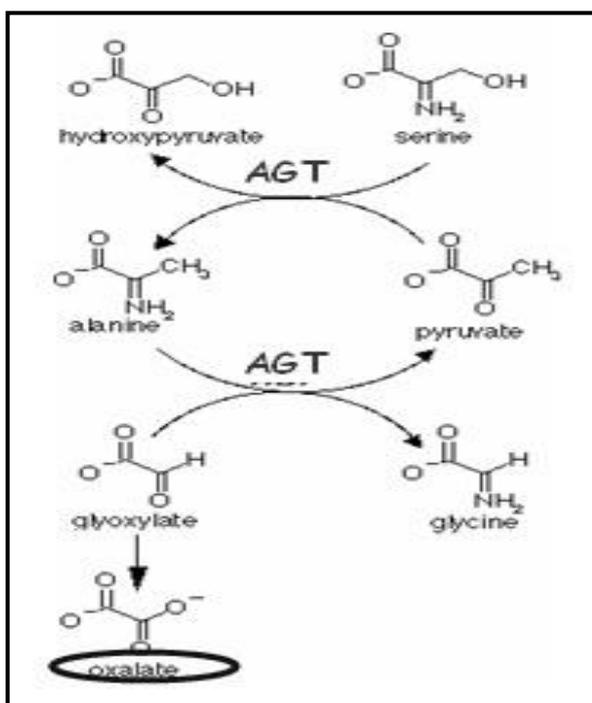


Figure 7 - Voie du glyoxylate

Par conséquent, un défaut de l'activité de cette enzyme conduit à une accumulation hépatique de glyoxylate, converti ensuite en oxalate par la lactate déshydrogénase dans le cytosol (Farinelli et Richardson 1983), ou par la glycolate oxydase dans le peroxyssome. Cette synthèse exagérée d'oxalate, dite hyperoxalurie, serait à l'origine de la neuropathie spécifique de l'oxaliplatine (Gamelin L., 2004). Dans la population générale, il est reconnu que lorsque l'augmentation du taux d'oxalate est franche ($>1000 \mu\text{mol/L}$), l'origine est plutôt entérique ou héréditaire (oxalose), et l'hyperoxalurie est qualifiée de primitive. Si elle est modérée (oxalate entre 500 et $700 \mu\text{mol/L}$), l'origine est idiopathique ou alimentaire et l'hyperoxalurie est qualifiée de secondaire. Ce travail est centré sur les hyperoxaluries primitives, afin d'identifier les paramètres génétiques pouvant être à l'origine d'un dysfonctionnement de l'AGT.

L'HP1 est caractérisée par un déficit enzymatique en AGT (alanine : glyoxylate aminotransférase), conduisant à l'augmentation du pool de glyoxylate qui sera métabolisé en oxalate. Cette enzyme est codée par le gène AGXT, constitué de 11 exons et situé sur le chromosome 2q37.3 de l'homme. Plusieurs phénotypes ont été observés, tels que :

- la perte d'activité catalytique de l'AGT par inhibition de son co-facteur, la pyridoxine
- l'accélération de sa dégradation,
- l'agrégation intra-peroxyssomale,

- la destination erronée vers la mitochondrie au lieu du peroxysome, son site d'action spécifique où se situe la synthèse du glyoxylate.

Cette dernière anomalie se rencontre chez environ un tiers des patients et concerne près de 90% de l'activité enzymatique. Bien que l'AGT soit toujours fonctionnelle, elle est rendue biologiquement inactive de par sa localisation intra mitochondriale (Danpure 1998).

De l'étude des génotypes des hyperoxaluries de type 1, il ressort que la combinaison des mutations Pro11Leu et Gly170Arg est présente dans plus de 30% des cas. Le polymorphisme Pro11Leu se traduit par une modification du lieu de destination de l'AGT, en la redirigeant vers la mitochondrie, plutôt que vers le peroxysome. La destination de l'AGT est codée par une séquence terminale ; en position C-terminale, pour diriger l'AGT vers le peroxysome, et en N-terminale pour la mitochondrie. Cette dernière est nouvellement synthétisée lorsque le sujet présente la mutation Pro11Leu. Cependant, une protéine dimérisée ne peut entrer dans les mitochondries, contrairement à l'entrée possible dans les peroxysomes. De plus, la dimérisation est effectuée avant l'entrée dans la mitochondrie ou le peroxysome ; la modification de la destination de l'AGT reste donc faible malgré la mutation Pro11Leu. La mutation Gly170Arg a pour conséquence de ralentir la dimérisation de l'AGT. La dimérisation de l'AGT étant retardée, sa modification de destination est augmentée à 90% lorsque la mutation Gly170Arg est combinée avec Pro11Leu (Dumont 2004) (*Figure 8*).

○ *L'hyperoxalurie primitive de type 2*

L'hyperoxalurie de type 2 (HP2) est plus rare, et les symptômes apparaissent plus tardivement que dans le type 1, vers 15 ans. Des lithiases récidivantes sont de même observées, cependant elles conduisent plus rarement à des insuffisances rénales terminales. L'origine de l'HP2 est un déficit enzymatique en glyoxylate (GR) et hydroxypyruvate réductase (HPR) causé par des mutations sur le gène de la GRHPR, principalement de type délétion. La consanguinité est un facteur de risque important de cette maladie autosomique récessive très rare. L'HP2 se caractérise par une déstabilisation du métabolisme du glyoxylate et de l'hydroxypyruvate : la glyoxylate réductase est inhibée provoquant ainsi une activité accrue de la lactate deshydrogénase (LDH), transformant les substrats en oxalate et L-glycérate. Ce dernier est un élément clé de cette forme d'hyperoxalurie. Les mutations en causes sont surtout des délétions, et des mutations ponctuelles (*Figure 9*).

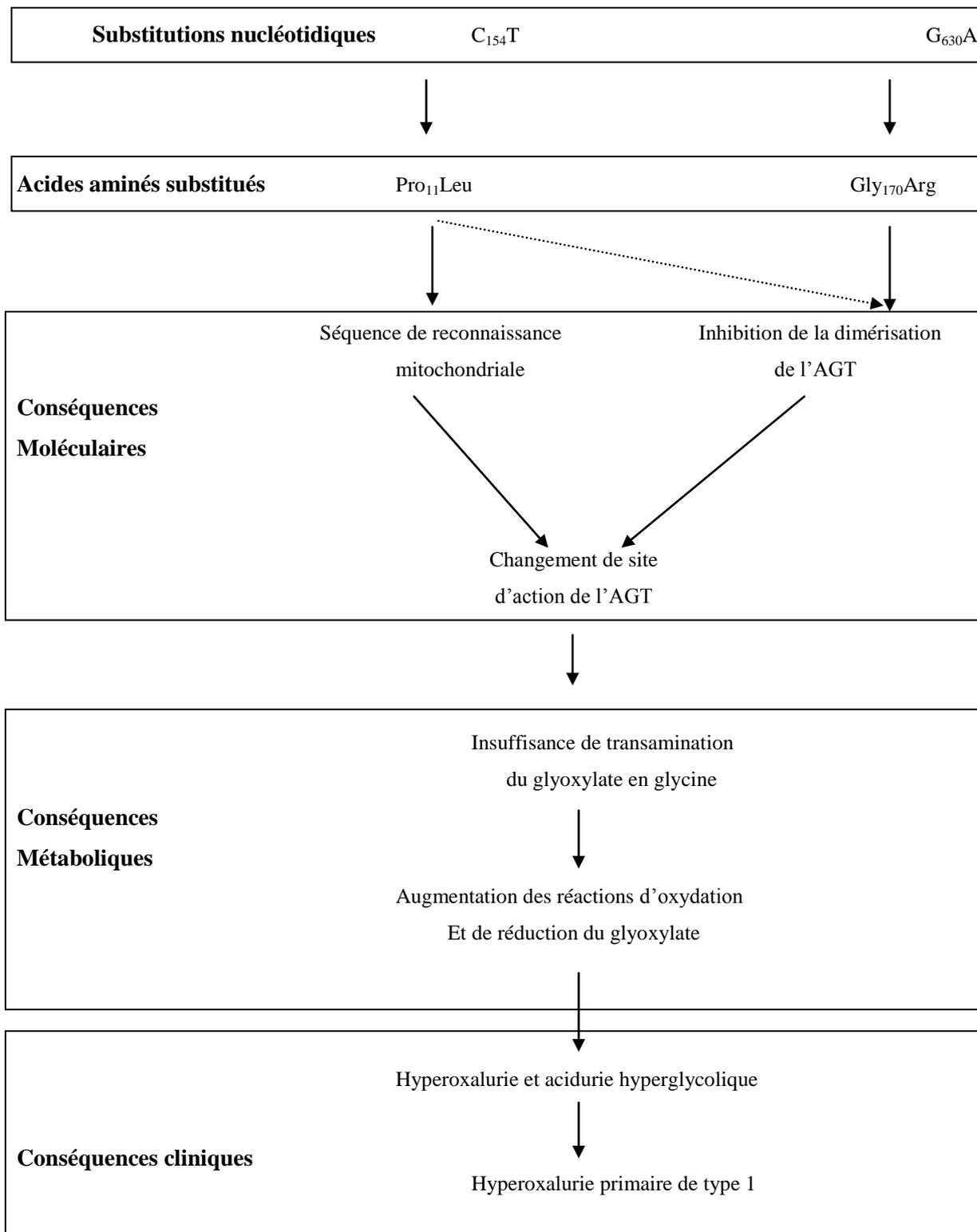


Figure 8 - Interrelations entre mutations et maladie, dans l'hyperoxalurie de type 1 (Danpure 1998)

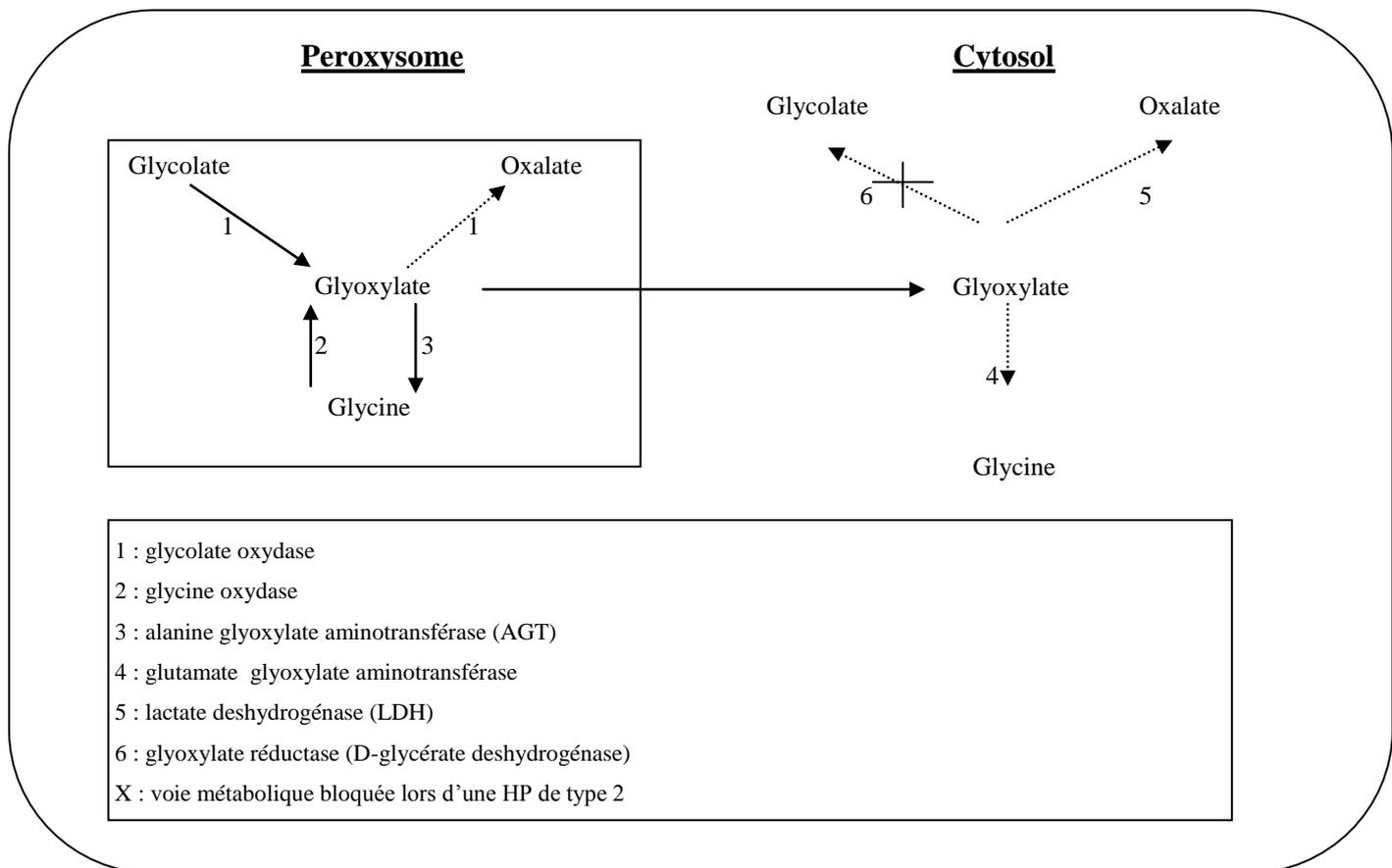


Figure 9 - Métabolisme hépatique supposé du glyoxylate chez l'homme

Le cancer colorectal

- **Généralités**

Le cancer colorectal est l'indication principale de l'oxaliplatine. En France en 2011, il représentait un cancer sur 6, dont le second plus fréquent chez la femme, après celui du sein, et le troisième chez l'homme, après le cancer de la prostate et du poumon. La population touchée est, à 95%, des personnes de plus de 50 ans. Malgré la diminution de son taux de mortalité ces vingt dernières années, due à la précocité des diagnostics ainsi qu'aux progrès des modalités thérapeutiques, le cancer colorectal reste la deuxième cause de mortalité par cancer en France, après le cancer du poumon (Institut national du Cancer 2011).

- **Histoire de la maladie**

Un cancer colorectal naît, dans 60 à 80% des cas, d'un adénome sous forme de polype ou bien d'une forme plane, plus difficile à détecter. Le risque de transformation d'un adénome en cancer est fonction de sa taille et de son degré de dysplasie, et s'étend en général de plusieurs mois à quelques années. Outre l'âge du patient, les facteurs de risques avérés d'adénome peuvent être constitutionnels, tels que les prédispositions génétiques et les antécédents personnels ou familiaux, ou bien liés à l'hygiène de vie, tels que le tabac, la

sédentarité, et la consommation excessive d'alcool, charcuterie ou viande rouge. Dans la population générale, trois degrés de personnes à risques de développer un cancer colorectal sont identifiés :

- Les personnes à **risque très élevé** de développer un cancer colorectal, lié à une prédisposition génétique :
 - Syndrome de Lynch (HNPCC)
 - Polypose adénomateuse familiale (PAF)

Le syndrome de Lynch, appelé aussi syndrome HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* ou cancer colorectal héréditaire sans polypose) est une anomalie touchant les gènes qui contrôlent la réparation des erreurs de réplication de l'ADN. Il engendre la formation de polypes dans la paroi du côlon mais pas en aussi grand nombre que dans le cas de la PAF. Les patients atteints par ce syndrome présentent un risque de développer un cancer colorectal au cours de leur vie de l'ordre de 10% à 50 ans et 40% à 70 ans (Agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie 2009), ainsi qu'un plus grand risque de développer d'autres cancers à l'extérieur du côlon : endomètre, ovaire, intestin grêle, estomac, voies biliaires, voies urinaires.

La PAF est caractérisée par le développement de centaines ou de milliers de polypes dans la paroi interne du côlon et du rectum dès l'adolescence. Individuellement, ces polypes ne sont pas plus dangereux que ceux apparaissant hors contexte de PAF. Cependant, en raison de leur nombre élevé, leur risque de devenir cancéreux s'accroît. Si une chirurgie prophylactique telle que la colectomie, n'est pas effectuée chez un patient atteint de PAF, son risque de développer un cancer avant l'âge de 40 ans est presque de 100 %. Ce syndrome ne représente que 1 % de tous les cancers colorectaux. Dans ce cas, une surveillance spécifique et une chirurgie prophylactique peuvent être indiquées. Elles doivent être évoquées et discutées avec les patients au cas par cas.

- Les personnes à **risque élevé** de développer un cancer colorectal :
 - Antécédent personnel d'adénome ou de cancer colorectal
 - Antécédent familial au premier degré de cancer colorectal ou d'adénome supérieur à 1 cm et survenu avant 65 ans
 - Deux ou plusieurs antécédents familiaux au premier degré de cancer colorectal quel que soit l'âge de survenue ;
 - Maladie inflammatoire chronique : rectocolite hémorragique ou maladie de Crohn particulièrement en cas de pancolite.
- Les personnes à **risque moyen** de développer un cancer colorectal :
 - Sujets de plus de 50 ans des deux sexes.

- **Diagnostic de la maladie**

Les signes cliniques d'un cancer colorectal sont tardifs et peu spécifiques, mais se manifestent le plus souvent par des rectorragies, des symptômes digestifs inhabituels, une masse abdominale ou rectale, ou bien encore un syndrome rectal. La première étape du diagnostic est l'interrogatoire du patient, permettant de déceler la présence de facteurs de risques et/ou de comorbidités, ainsi que des antécédents personnels et/ou familiaux de cancer ou d'adénome colorectal. Puis, le médecin examine l'abdomen du patient, réalise un toucher pelvien ainsi qu'une palpation des aires ganglionnaires, et évalue son état général et nutritionnel. A ce stade, lorsque le médecin suspecte un adénome ou un cancer colorectal, le patient est dirigé vers un spécialiste qui lui prescrit une coloscopie totale associée aux biopsies des lésions suspectes. C'est l'analyse anatomopathologique des biopsies qui permet d'établir le diagnostic final. Si le cancer colorectal est évoqué, alors un bilan d'extension est effectué, en deux parties :

- **Biologie** : par le dosage des Antigènes carcino-embryonnaires, marqueur tumoral aidant à la caractérisation du pronostic lors de situations métastatiques, un hémogramme ainsi que l'évaluation des fonctions rénales et hépatiques
- **Imagerie** : Tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne avec injection d'un produit de contraste.

A l'issue de ces examens, un bilan pré-thérapeutique est établi, définissant l'état général du patient selon la classification de l'OMS (*annexe 1*) et les comorbidités existantes, et permettant ainsi l'évaluation de la faisabilité des différentes options de traitement. De plus, un bilan nutritionnel clinique et biologique (poids, taille, perte de poids) est formulé afin d'assurer, si besoin, une prise en charge nutritionnelle du patient. C'est examen est indispensable puisque, lors du diagnostic d'un cancer colorectal, 10 à 15% des patients sont dénutris.

Dans certains cas, le spécialiste peut suspecter une forme héréditaire de cancer :

- antécédents familiaux ;
- et/ou critères endoscopiques (grand nombre de polypes) ;
- et/ou critères anatomopathologiques ou moléculaires

Alors, une consultation d'oncogénétique doit être proposée au patient afin de rechercher des mutations telles que BRAF ou Kras. Elle permet de définir le rythme et les modalités de la surveillance du patient et, après accord du patient, des membres de sa famille. Les conclusions peuvent nécessiter plusieurs mois.

- **Le dépistage de la maladie**

Selon le risque présenté par le patient, différents dépistages sont entrepris.

Concernant les personnes à **risque moyen** de développer un cancer colorectal, le dépistage repose sur :

- une recherche de sang dans les selles, par un test Hemoccult II, tous les 2 ans chez les sujets âgés de 50 à 74 ans
- suivie d'une coloscopie totale chez les individus dépistés positifs, pour rechercher un cancer ou un adénome

Un test Hemoccult II négatif ne permet pas d'écartier l'éventualité d'un cancer colorectal. En revanche, sa répétition tous les 2 ans entraîne une amélioration de la sensibilité du dépistage.

Pour les sujets à **risque élevé** de cancer colorectal, le dépistage repose sur une coloscopie dès 45 ans, ou bien 5 ans avant l'âge du diagnostic d'un cancer semblable chez un apparenté de moins de 65 ans. Le dépistage du cancer dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin fait l'objet d'un protocole de surveillance endoscopique et biopsique spécifique.

Concernant les sujets à **risque très élevé**, le dépistage relève d'une prise en charge spécialisée.

- **Prise en charge thérapeutique**

La stratégie thérapeutique envisagée par le médecin oncologue dépend du stade et de la localisation de la tumeur ainsi que de l'âge du patient. Elle est mise en place en accord avec le patient et avec un avis d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Afin d'adapter au mieux les choix thérapeutiques, une différence est faite entre les cancers du côlon ou du tiers supérieur du rectum et les patients atteints de cancers des 2/3 inférieurs du rectum (*Tableau 2*).

Deux types de protocoles de chimiothérapie sont en général déployés dans le cancer colorectal :

- **FOLFOX** : c'est l'association de 5-FU, de folinate de calcium et d'oxaliplatine
- **FOLFIRI** : c'est l'association de 5-FU, de folinate de calcium et d'irinotécan

Si le patient présente une contre-indication au 5-FU, la molécule peut être remplacée par le raltitrexed. Lors de cancers métastatiques, une thérapie ciblée telle que les anticorps monoclonaux, peut être associée à la chimiothérapie. Le cétuximab est un anticorps monoclonal murin se fixant sur les récepteurs à l'Epidermal Growth Factor (EGF). En situation normale, la fixation de l'EGF sur son récepteur provoque, par activation des voies MAP kinase, une transcription des gènes de prolifération cellulaire et, par suite, un développement tumoral.

Stade de la tumeur	Cancer du côlon ou du 1/3 supérieur du rectum	Stade de la tumeur	Cancer des 2/3 inférieurs du rectum
		Stade 0 = Tis-T1sm1	➤ La chirurgie seule est recommandée, sauf exception signalée en RCP
Stade I = T1-T2 N0 M0	➤ La chirurgie seule est recommandée, sauf exception signalée en RCP	Stade I = T1-2 N0 M0	➤ La résection chirurgicale est le traitement de référence
Stade II = T3-T4 N0 M0	En l'absence de facteurs de risque de récurrence : ➤ chirurgie En présence de facteurs de risque de récurrence : ➤ chirurgie ➤ chimiothérapie adjuvante selon le rapport bénéfice/risque évalué en RCP et avec le patient	Stade II et III : T3, N0, M0 et T1 à T3N+ résécables	➤ Radiothérapie ou radiochimiothérapie suivie d'une chirurgie
Stade III = tous T N1-N2 M0	➤ chirurgie ➤ chimiothérapie adjuvante dans un délai de 8 semaines après la chirurgie, sur une durée de 6 mois	Stade II et III : tumeurs T4, M0 dont la résection R0 est incertaine	➤ Radio-chimiothérapie préopératoire puis réévaluation par imagerie pour discussion en RCP du type d'exérèse à envisager ➤ Toute indication d'une chimiothérapie adjuvante ne peut être faite qu'après discussion en RCP
Stade IV : stade métastatique	Prise en charge au cas par cas, selon l'avis du RCP et : ➤ le caractère symptomatique ou non de la tumeur primitive ➤ le caractère résécable ou non des métastases. ➤ en l'absence de contre-indication, la plupart des patients se voient proposer une chimiothérapie	Stade IV : stade métastatique	Prise en charge au cas par cas, selon l'avis du RCP et : ➤ le caractère symptomatique ou non de la tumeur primitive ➤ le caractère résécable ou non des métastases. ➤ en l'absence de contre-indication, la plupart des patients se voient proposer une chimiothérapie

Tableau 2 - Protocoles thérapeutiques dans le cancer colorectal, selon le stade et le type de cancer (Haute Autorité de Santé 2008)

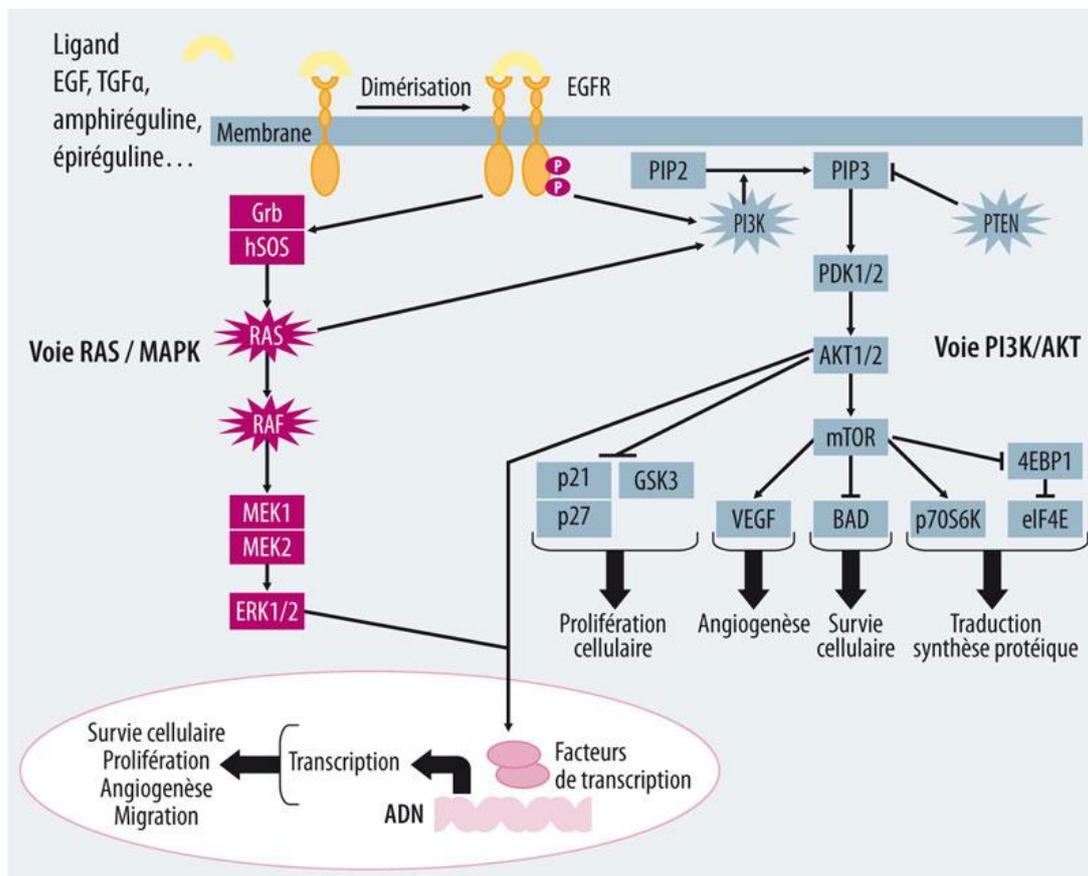


Figure 10 – Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval (Lelièvre 2010)

L'action du cétuximab permet de bloquer ces phosphorylations inhibant ainsi la tumorigénèse. Cependant, ce traitement n'est efficace que si le patient ne présente pas de mutation sur le gène Kras. En effet, comme illustré ci-après (Figure 11), la mutation Kras provoque une stimulation continue de la cascade réactionnelle menant à la transcription des gènes de prolifération cellulaire, malgré la fixation du cétuximab sur l'EGFR. Avant d'administrer cet anticorps, le médecin doit donc prescrire à son patient un dépistage de mutations sur le gène codant pour la protéine RAS.

Pour tous les patients, le choix des molécules est discuté en RCP. Au même titre que l'état général du patient, la décision doit tenir compte du stade et des caractéristiques de la tumeur ainsi que du projet thérapeutique du patient.

De plus, avant chaque cure, le bilan standard comprend un examen clinique (température, poids, taille, état général, examen de l'abord veineux, mesure de la pression artérielle, examen cutané, évaluation de la tolérance aux cures précédentes et recherche d'effets secondaires) et des examens biologiques dont la nature est à adapter au traitement reçu. En fonction des résultats, la cure de chimiothérapie peut être reportée ou les doses sont éventuellement adaptées.

Lors du diagnostic d'un cancer, la prise en charge médicale est globale, incluant :

- la surveillance des vaccinations

- la surveillance nutritionnelle
- le diagnostic et la prise en charge des états dépressifs
- l'aide au sevrage tabagique et alcoolique

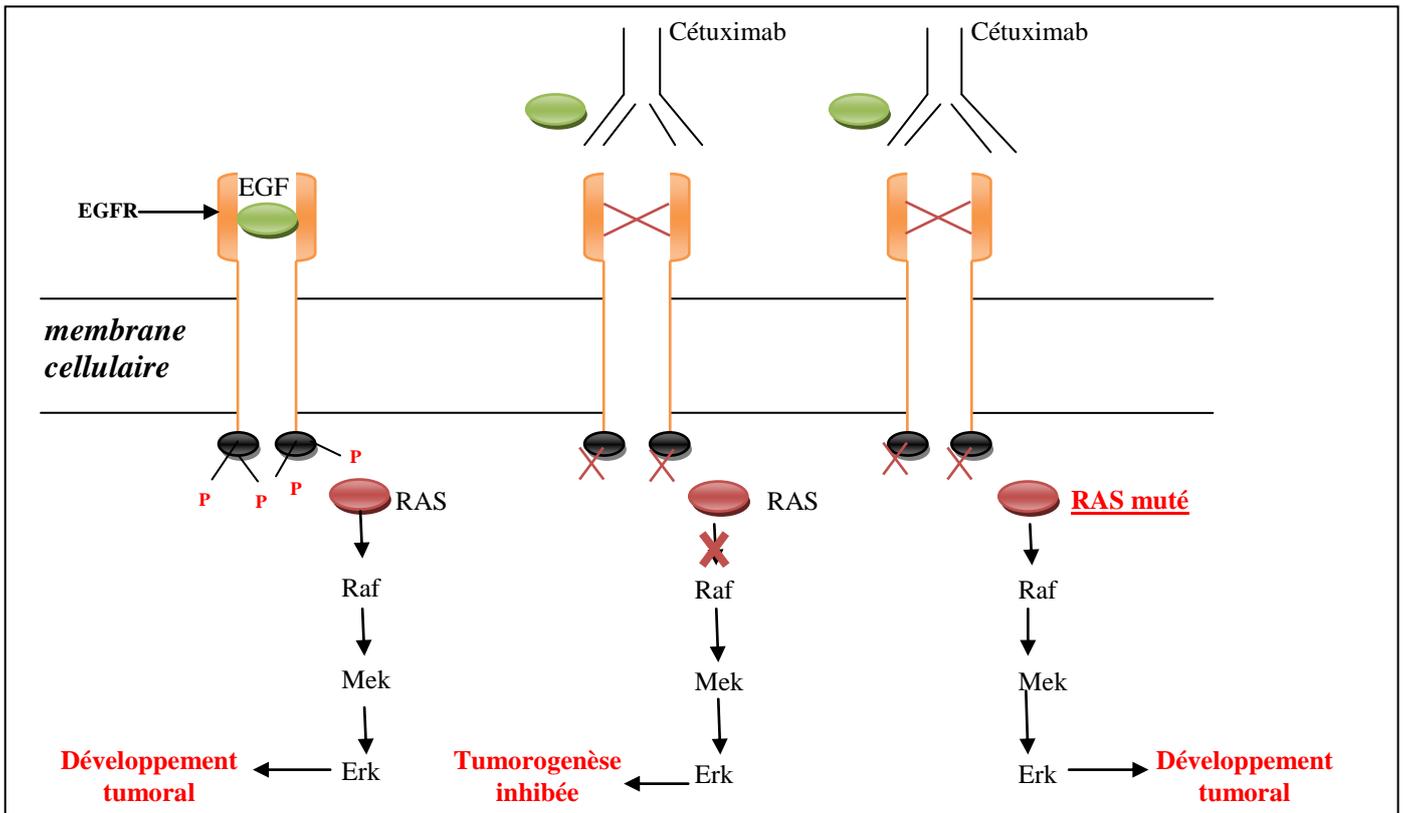


Figure 11- Conséquences du génotype RAS muté sur le mécanisme d'action du Cétuximab

- **Suivi du patient**

Le suivi du patient atteint d'un cancer colorectal consiste à détecter les effets indésirables tardifs liés au traitement, mais aussi de possibles récurrences ou le développement d'un second cancer. Concernant les patients diagnostiqués à risque moyen, le suivi consiste en plusieurs examens (*Tableau 3*).

Examens	Rythme
Examen clinique ⁴⁵	Tous les 3 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans
ACE (optionnel) ⁴⁵	Tous les 3 mois les 3 premières années avec bilan en cas d'élévation
Coloscopie	1- Si coloscopie initiale incomplète ou de mauvaise qualité ou non réalisée en préopératoire : à refaire dans les 6 mois postopératoires 2- Après la chirurgie : contrôle à 2 ou 3 ans puis tous les 5 ans, si normale 3- Le rythme dépendra de la présence ou non d'adénomes. La coloscopie doit être poursuivie jusqu'à un âge raisonnable dont l'appréciation sera faite par le praticien.
Coloscopie virtuelle	En cas d'impossibilité de réaliser une coloscopie
Tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne avec injection	La fréquence est à déterminer en fonction du stade et des facteurs de risque.
<i>À défaut d'une TDM thoraco-abdomino-pelvienne avec injection → TDM sans injection complétée par</i>	
Échographie abdominale	En général, tous les 3 à 6 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans
Radiographie pulmonaire	Annuelle pendant 5 ans
TEP-TDM du corps entier	En cas d'élévation de l'ACE et négativité ou ambiguïté du bilan par ailleurs

Tableau 3 - Programme de suivi post-thérapeutique en dehors des patients à risque élevé ou très élevé (Haute Autorité de Santé 2008)

La pharmacogénétique

- **Généralités**

La pharmacogénétique étudie le lien entre les variabilités interindividuelles de réponse aux traitements et certains mécanismes génétiques. Cette discipline est apparue à la fin des années 1950, lorsqu'une étude a démontré que les personnes déficitaires en Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase étaient sujettes à des crises d'anémies hémolytiques lors de la prise de primaquine, un antipaludéen.

Il existe un lien étroit entre le génotype d'un individu, son phénotype, ainsi que les différentes conséquences cliniques. Les séquences de gènes peuvent être modifiées dans le temps et selon les individus : elles peuvent subir une duplication ou amplification, une mutation ou une délétion. Lorsque ces variations concernent des séquences génétiques codant pour des enzymes clés d'un métabolisme médicamenteux, alors les patients ne présentent pas les mêmes atouts pour répondre à un traitement. Un génotype normal conduira à une réponse idéale, tandis que dans les autres cas, le sujet sera exposé à des risques de surdose en molécule thérapeutique, si le métabolisme est trop lent ou inexistant, ou bien à un risque

d'inefficacité du traitement, si son métabolisme est rendu ultra rapide par des enzymes surexprimées. Cet enclenchement des évènements du génotype à l'état clinique démontre le rôle clé de la pharmacogénétique. Bien que les intoxications dues à des molécules thérapeutiques ne soient pas toutes liées à une anomalie génétique, cette approche peut tout de même permettre de dépister de manière simple et rapide les patients à risque.

- **Ses applications et sa portée**

Bien que l'utilisation en routine soit encore assez restreinte, l'usage de la pharmacogénétique se développe, notamment en oncologie où les traitements possèdent un faible index thérapeutique. La prévention pré-thérapeutique des toxicités au 5-Fluorouracile est l'illustration du développement et de la portée de la pharmacogénétique. Le 5-FU est un cytotoxique antimétabolique antipyrimidique, indiqué dans de nombreux protocoles de chimiothérapie. Il est métabolisé, pour plus de 80%, en 5-fluorodihydrouracile (5-FUH2), par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) (Figure 12).

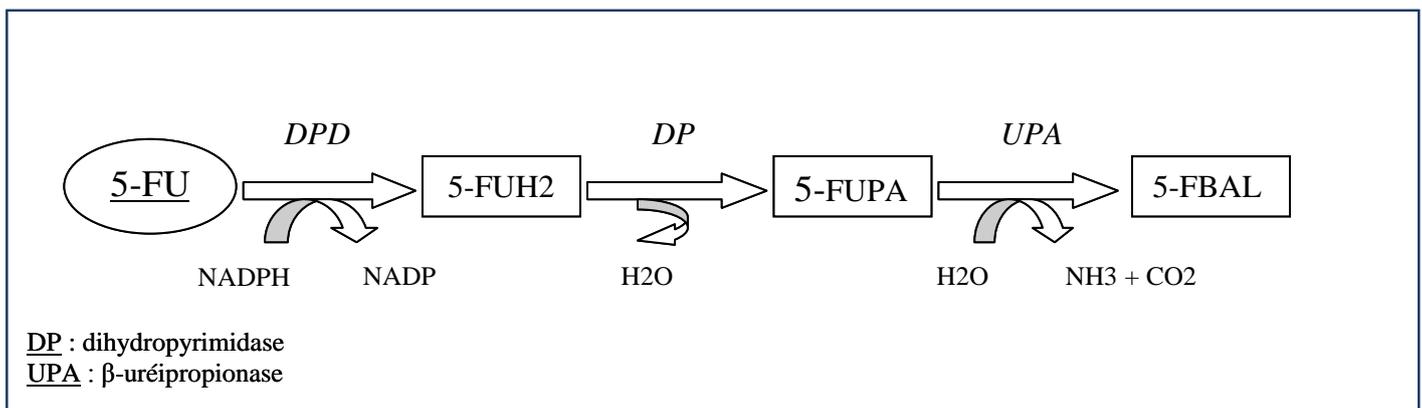


Figure 12 – Mécanisme de dégradation du 5-FU dans l'organisme

Ainsi un déficit, même partiel, en DPD favorise l'apparition d'une toxicité sévère voire mortelle (Coriat et Chaussade 2007). Or, le 5-FU est un des traitements les plus administrés en oncologie. Ainsi, avec une estimation des déficits totaux en DPD à 0.3-0.5% dans la population 600 patients présentent un risque de toxicité mortelle par an en France ce qui n'est pas acceptable surtout dans le cadre d'un traitement adjuvant. Certains centres de lutte contre le cancer, dont l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, ont donc mené des recherches et développé leur méthode pharmacogénétique afin d'améliorer la prise en charge des patients en adaptant leur traitement par 5-FU. L'étude des différents génotypes conduisant à l'expression de la DPD a mis en évidence plus de 30 mutations potentielles, dont les principales recherchées sont recensées dans l'annexe 2. Couplé au séquençage du gène, le phénotype de la DPD est également évalué par le rapport UH_2/U (E. Gamelin, Boisdron-Celle, et Morel 2005). Une fois les résultats obtenus, les professionnels possèdent toutes les

données pour adapter la dose à la première cure. Le patient est ensuite suivi durant tout son traitement afin que les doses soient continuellement ajustées.

Les protocoles de traitement par l'irinotécan peuvent aussi être adaptés par des méthodes pharmacogénétiques. L'irinotécan est normalement métabolisé en métabolite actif, le SN 38, par une carboxylestérase 2 (CES 2) puis en glucurono-SN-38 (SN38G) par l'uridine diphosphate glucuronyl-transférase 1A1. Tandis que le déficit enzymatique en CES 2 n'est en général pas de source génétique (E. Gamelin, Boisdron-Celle, et Morel 2004), des mutations sur le gène codant pour l'UGT 1A1 ont montré des variations de phénotype. En effet, l'UGT 1A1*1 possédant 6 répétitions TA dans son promoteur conduit à une conjugaison normale de du SN-38. Alors que l'UGT 1A1*28, possédant 7 répétitions TA, conduit à une faible glucuroconjugaison, et donc à une toxicité accrue, par accumulation du métabolite SN-38 actif. Les toxicités généralement observées sont de type digestives telles que les diarrhées, voire hématologiques dans certains cas, avec des neutropénies fébriles pouvant entraîner le décès du patient.

- ***Le théranostique***

Ces exemples illustrent les objectifs et les bénéfices possibles de la pharmacogénétique. En détectant les personnes à risque pour certains traitements, la pharmacogénétique est une des premières étapes de la prise en charge personnalisée des patients. Elle permet d'établir un diagnostic afin d'adapter une démarche thérapeutique : c'est le concept de théranostique. Il a pour but de :

- prévenir les intolérances sévères à certains traitements
- d'améliorer l'efficacité des traitements en les adaptant de manière plus personnalisée
- de réduire le temps et les coûts associés au traitement des intoxications sévères

L'objectif d'optimisation des soins dans le contexte actuel français permet à cette approche d'être soutenue autant par les professionnels de santé, que les patients eux-mêmes, ainsi que par les autorités de santé. L'investissement dans le développement d'outils de théranostique par de nombreux laboratoires pharmaceutiques, Roche Diagnostic[®], Bayer Diagnostic[®] ou BioTheranostic[®] (BioMérieux[®]), illustre l'expansion de ces nouvelles méthodes.

- ***Exemple d'un outil de théranostique***

Les puces à ADN représentent un des outils de théranostique développé aujourd'hui par les industriels. Au sein de l'ICO Paul Papin, nous avons eu l'occasion, à la demande d'un laboratoire, de tester et d'évaluer leur test diagnostique visant au dépistage d'une dizaine de mutations sur le gène de la DPD.

Globalement, la méthode consiste, après amplification de l'échantillon par PCR, à hybrider l'ADN du patient avec l'ADN témoin fixé sur la puce (Figure 13). L'affinité entre les fragments est dépendante du génotype du patient : sauvage, hétérozygote ou homozygote muté.



Figure 13 - Illustration de la puce à ADN utilisée dans le kit DPD

Lorsque l'étape d'hybridation est terminée, une réaction enzyme-substrat (Figure 14) produisant un précipité bleu est effectuée, permettant ainsi de révéler la puce.

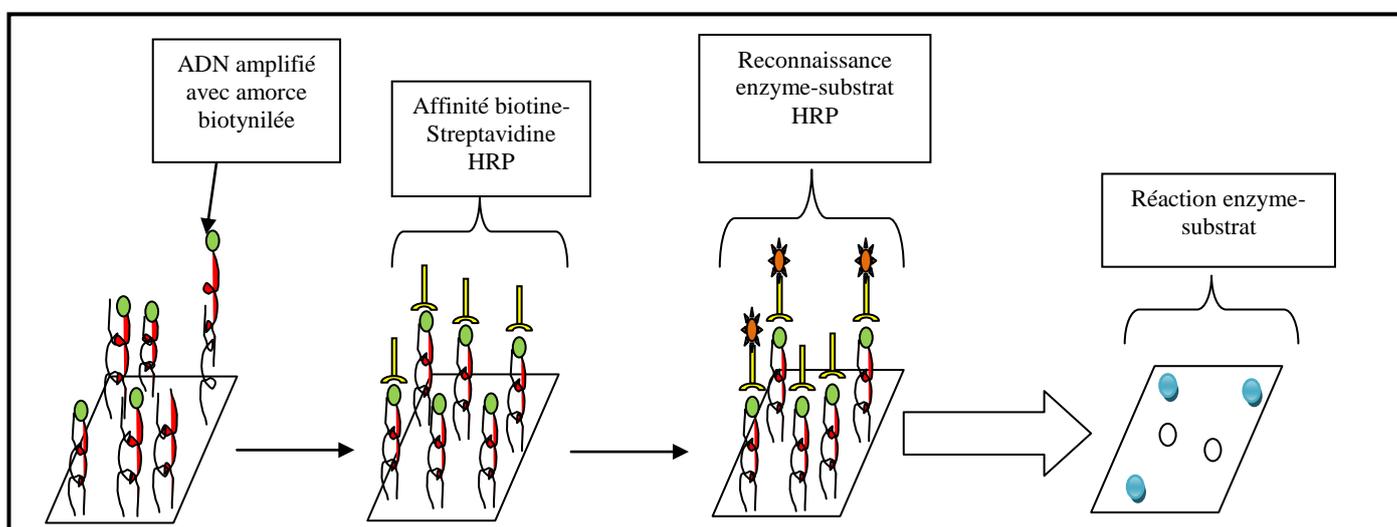


Figure 14 - Principe de fonctionnement du kit DPD

A l'œil nu, l'interprétation finale de la puce n'est pas possible. En effet, même si les puits colorés sont visibles, l'opérateur ne sait pas pour autant à quel génotype chacun correspond. Trois profils peuvent être obtenus :

- le patient est homozygote sauvage (non muté) : les précipités se trouvent seulement dans les puits où de l'ADN sauvage est présent
- le patient est homozygote muté : les précipités ne sont observés que dans les puits où de l'ADN muté est présent
- le patient est hétérozygote : les précipités sont obtenus dans les puits avec de l'ADN sauvage mais aussi dans ceux avec de l'ADN muté.

C'est une caméra reliée à un logiciel informatique qui traduit la présence ou non d'un précipité en un génotype (Figure 15). C'est une part intégrante de cet outil de théranostique.

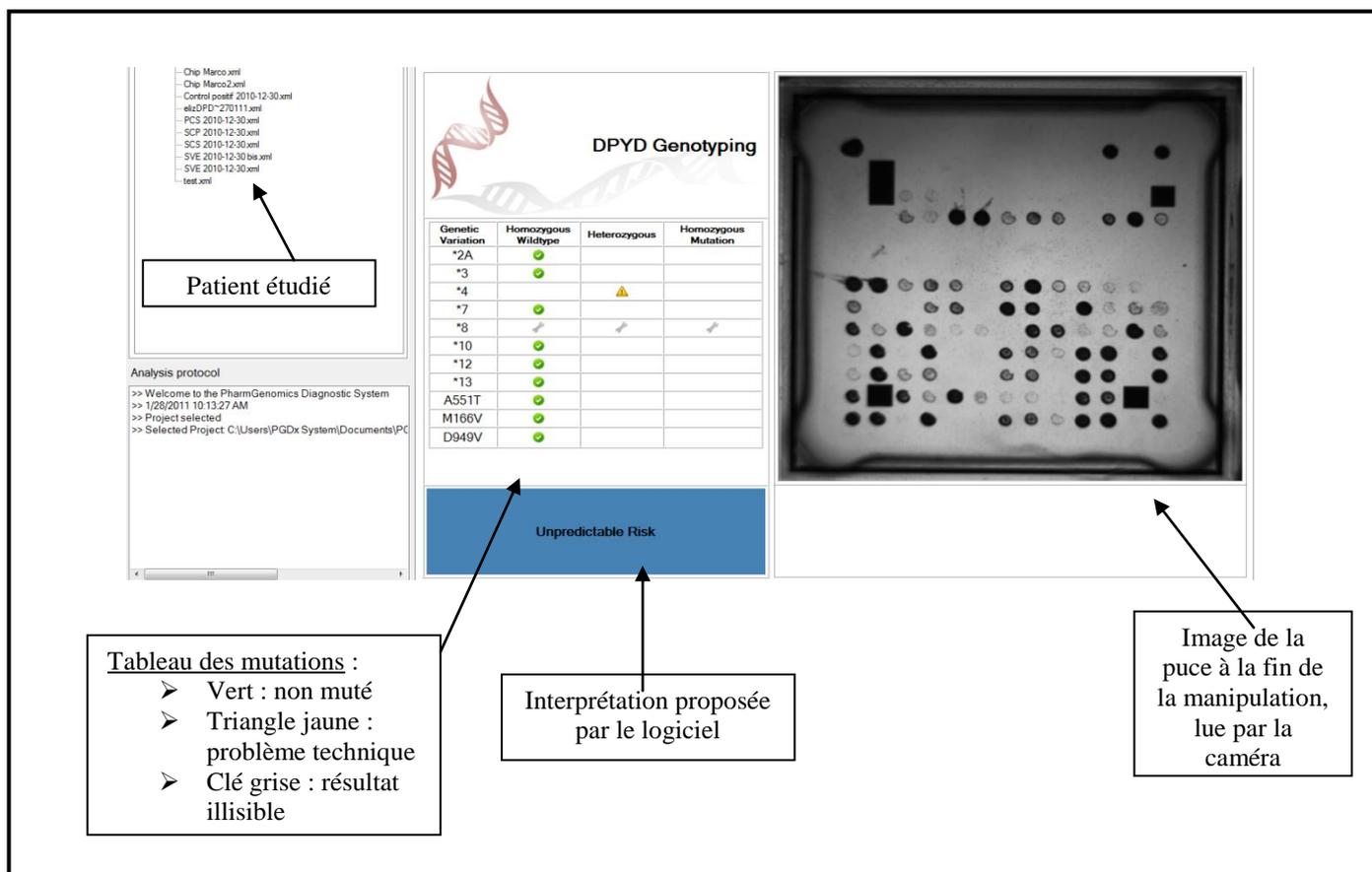


Figure 15 - Révélation de la puce par l'outil caméra/logiciel informatique

Un compte-rendu diagnostique est finalement délivré par le logiciel, indiquant le risque associé au génotype du patient : « *no increased risk* », « *unpredictable risk* », « *increased risk-DPD deficiency* », « *highly increased risk-DPD deficiency* ». Cette interprétation est basée sur l'analyse simultanée du nombre de mutations présentes mais surtout du type de ces mutations.

L'évaluation de cet outil de théranostique a conduit à plusieurs conclusions. Dans un premier temps, concernant l'aspect technique du procédé, il s'est avéré que la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité des résultats ne furent pas convaincantes. Des discordances et des variations dans les résultats d'échantillons témoins ont été observées. Concernant l'approche théranostique déployée ici, les conclusions fournies automatiquement par le logiciel après interprétation de la puce nécessitent d'être prises avec beaucoup de précautions. Il est indispensable qu'un professionnel de santé observe ces résultats et formule personnellement ses conclusions. La portée des résultats est trop importante pour s'affranchir d'un avis médical.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les neuropathies périphériques, dites précoces, sont limitantes dans le traitement par oxaliplatine. Comme expliqué auparavant, il est possible qu'un déficit fonctionnel de l'enzyme AGT, conduisant à des difficultés d'élimination de l'oxalate, puisse être à l'origine de ces toxicités (L. Gamelin 2004). L'étude Neuroxa répond au besoin de mieux comprendre le mécanisme et les prédispositions à ces intolérances induites par l'oxaliplatine, en vue d'améliorer le confort et la prise en charge du patient. Elle est randomisée en double aveugle, de phase III, et menée en multicentrique, dont l'ICO Paul Papin. Son principal objectif est d'évaluer l'efficacité du calcium et du magnésium en perfusion intraveineuse dans la prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine en traitement de première ligne du cancer colorectal.

Rétrospectivement à cet essai Neuroxa, une étude ancillaire est menée, dans le but d'analyser la présence ou non de facteurs prédisposant à ces neurotoxicités aiguës. Basée Précisément, l'équipe se concentre sur le dépistage des mutations A1142G et C154T du gène codant pour l'AGXT, dont la présence pourrait être à l'origine du déficit fonctionnel de l'enzyme et, par suite des toxicités neurologiques. Le rapprochement entre les altérations génétiques observées et les toxicités recensées permettra d'appréhender le niveau de corrélation entre les deux phénomènes et de déterminer si ces polymorphismes génétiques sont des facteurs de prédisposition. Seule cette étude ancillaire sera décrite dans ce rapport.

La sensibilité, la spécificité ainsi que la robustesse de la méthode de dépistage des mutations génétiques devront être rigoureusement prouvées afin d'assurer la pertinence des résultats obtenus. Enfin, une interprétation cohérente des résultats révélés sera menée, permettant d'identifier les conséquences et les suites à donner à ce travail. Dans le cas où l'impact des mutations est avéré, la faisabilité de l'implémentation du dépistage en routine devra être évaluée, mettant en avant les moyens nécessaires, qu'ils soient financiers et humains. Dans le cas contraire, les possibles biais et/ou difficultés à reporter convenablement les données devront être identifiés, afin de statuer sur l'origine du résultat négatif. *Est-il imputable à une absence de corrélation réelle entre les paramètres, ou bien à la présence d'un biais majeur, pouvant conduire dans ce cas à renouveler l'étude ?*

PATIENTS, MATERIEL ET METHODE

Patients

Le dépistage des mutations a été effectué pour tous les patients inclus dans le bras placebo de l'étude Neuroxa.

- **Critères d'inclusion et non inclusion**

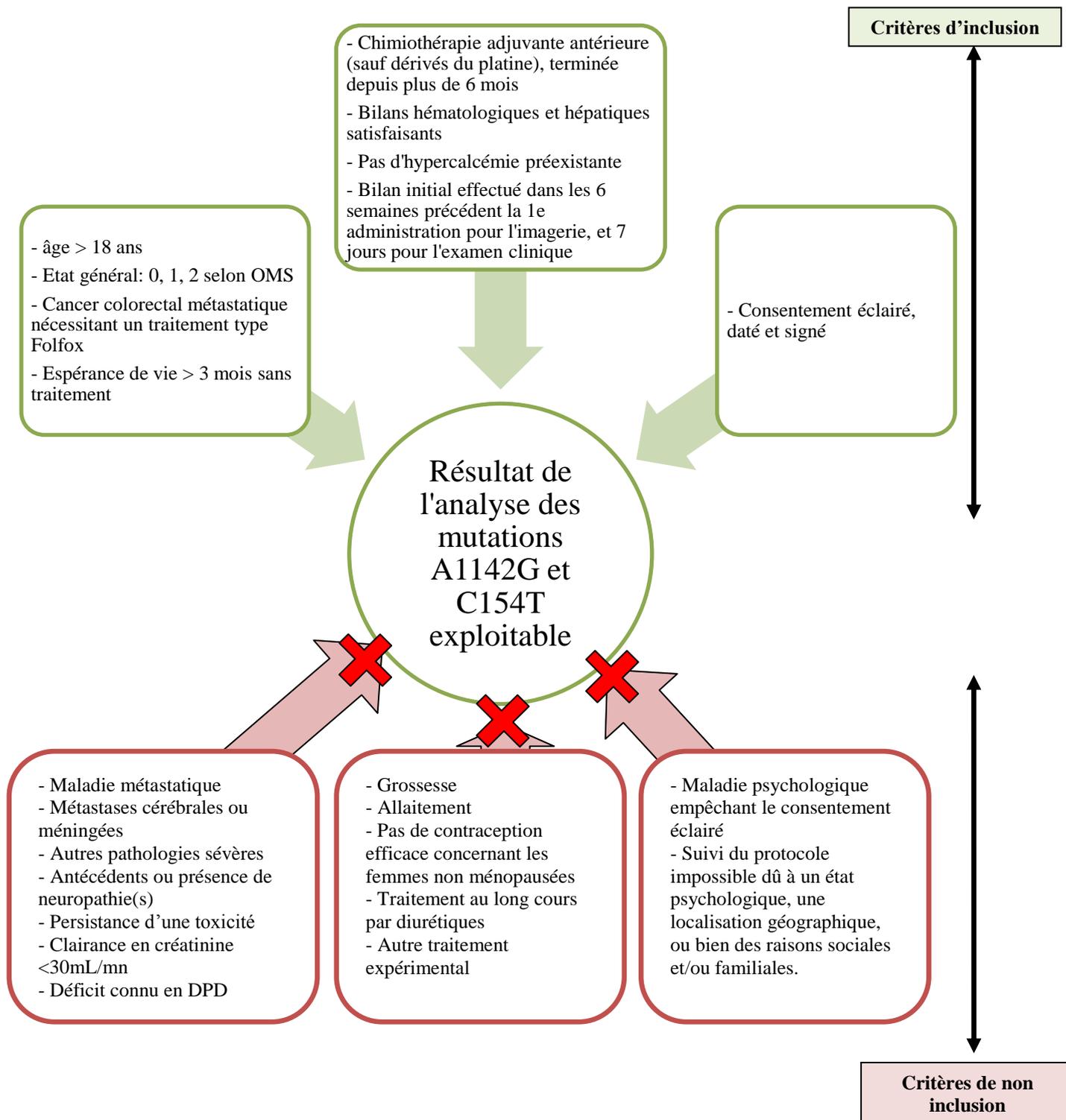


Figure 16 - Critères d'inclusion et de non inclusion dans l'étude « Neuroxa »

• **Traitement administré**

Les patients inclus dans l'étude, selon les critères précédents, ont tous reçu un traitement par Oxaliplatine, selon le protocole « de Gramont » (de Gramont, Figer, et Seymour 2000), soit :

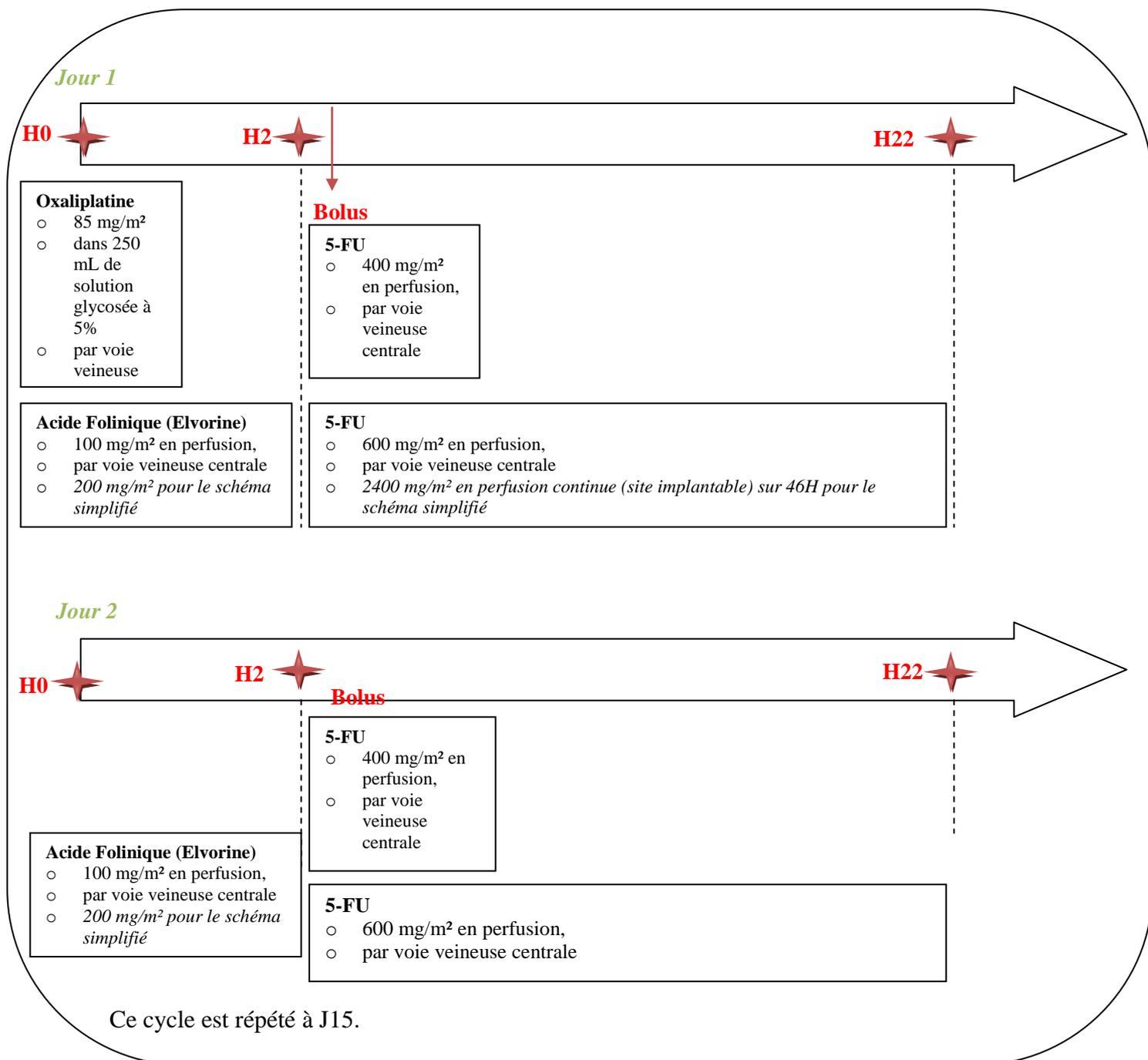


Figure 17 - Protocole d'administration de l'oxaliplatine dans le cadre de l'étude Neuroxa

Matériel

L'étude des génotypes de l'AGXT est réalisée sur de l'ADN génomique, isolé à partir d'un prélèvement sanguin du patient, selon des méthodes de lyse et de centrifugation.

- **Matériel nécessaire au dépistage des mutations**

- **Isolement des leucocytes**

La première étape consiste à isoler les leucocytes des globules rouges. Pour cela, une solution de lyse spécifique des globules rouges (volume de 500 µL), dont la composition n'est pas révélée par le laboratoire, est introduite dans le milieu. Ensuite, par agitation rotative à 45 tours par minute pendant 10 minutes et par centrifugation à 2500 tours par minute pendant 5 minutes, les leucocytes sont isolés et récupérés dans le culot du tube.

Une deuxième solution (volume de 500 µL) est ensuite utilisée afin de lyser les leucocytes et récupérer les acides nucléiques. A cet instant, il est possible de congeler la solution à -20°C afin de conserver l'ADN du patient.

- **Extraction de l'ADN génomique**

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée de manière automatisée, en utilisant les propriétés de l'ADN, telle que la charge négative (*Figure 18*). Après décongélation de l'échantillon à température ambiante, un volume de 300 µL de leucocytes isolés est prélevé. La méthode consiste à fixer l'ADN sur des billes magnétiques afin de le transférer, à l'aide d'un barreau magnétique, d'un bain de lyse à plusieurs bains successifs de lavage. Cette technique permet d'obtenir un échantillon d'ADN génomique purifié rapidement et efficacement puisqu'elle permet d'extraire 16 échantillons en 35 minutes. Elle est aussi peu contraignante car seulement 1 mL de sang total est nécessaire. L'ADN peut ensuite être conservé à 4°C, puis à -20 °C sur le long terme.

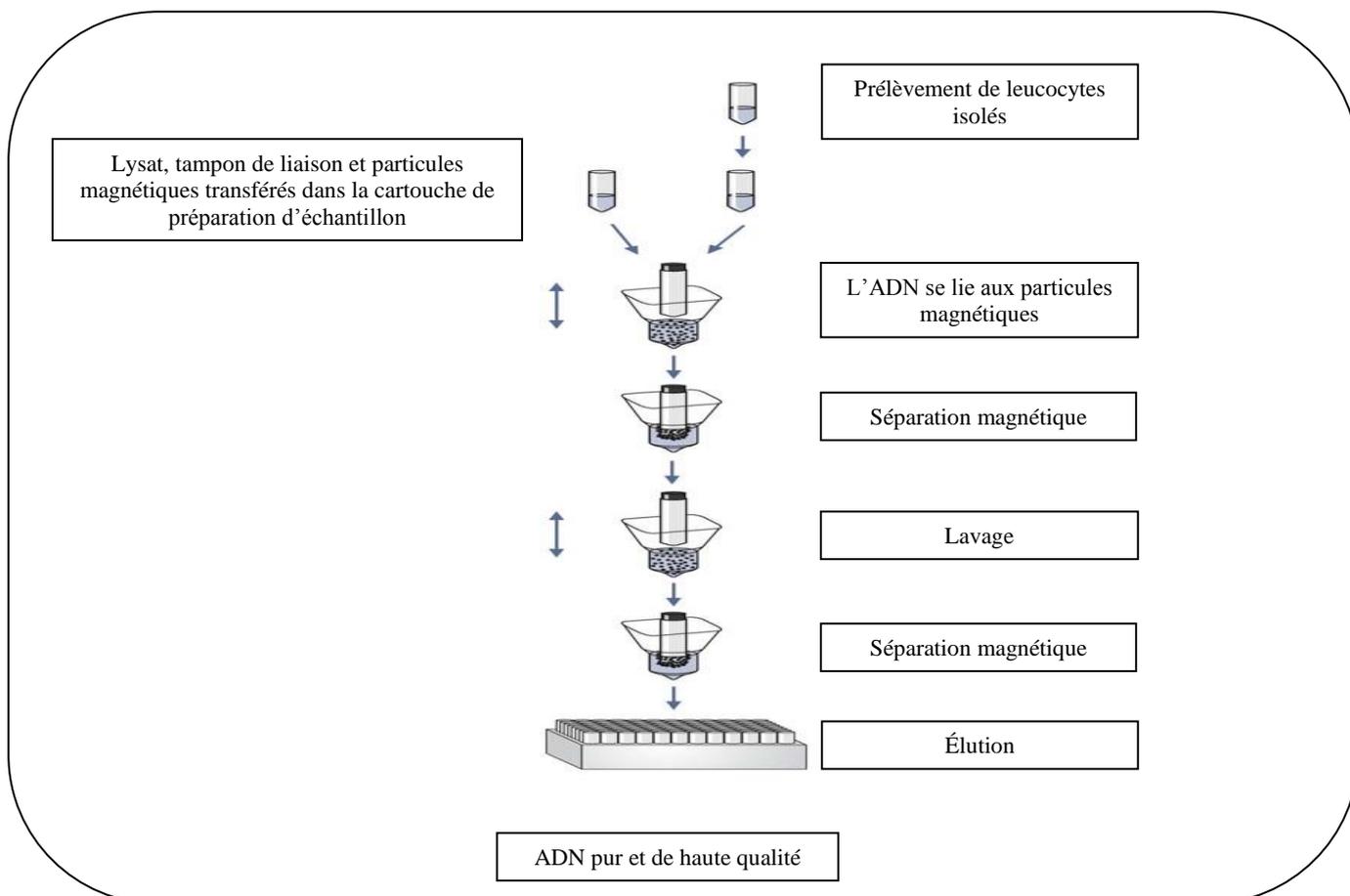


Figure 18 - Méthode d'extraction des acides nucléiques (Qiagen, 2011)

- **Matériel nécessaire à l'évaluation de la neurotoxicité aigüe**

L'étude de la corrélation entre les mutations de l'AGXT et l'apparition de neurotoxicités nécessite d'une part l'ADN du patient, mais aussi les rapports d'examen clinique du médecin, associés aux questionnaires d'auto-évaluation remplis par les patients. Les informations générées par ces rapports assurent un suivi permettant de recenser les effets secondaires déclarés pendant mais aussi quelques temps après l'administration d'oxaliplatine. Le contenu de ces documents est détaillé dans la partie méthode.

Méthode

- **Amplification par Polymérisation en chaîne (PCR)**

Dans un premier temps, l'échantillon d'ADN du patient est amplifié par PCR, afin d'accroître la quantité de matière nécessaire à la réalisation des analyses, mais aussi pour diminuer la manipulation de l'échantillon original et ainsi réduire le risque de contamination de celui-ci.

Lors de cette étude, les réactions de PCR ont été réalisées en « multiplex », permettant la recherche simultanée des deux mutations, A1142G et C154T, par l'intégration des deux amorces respectives dans chaque puits à analyser. En vue d'effectuer ensuite un pyroséquençage, les amorces utilisées sont biotynilées, c'est à dire qu'une molécule de biotine, appelée aussi vitamine B8, est fixée sur l'extrémité 5' (Figure 19).

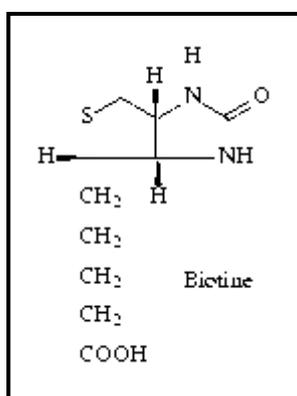


Figure 19 - Représentation d'une molécule de biotine

Dans le cadre de ce travail, le protocole de la réaction de PCR est le suivant :

- <u>Lancement</u> :	94°C	5 minutes	
- <u>Dénaturation</u> :	94°C	30 secondes	
- <u>Hybridation des amorces</u>	55°C	30 secondes	
- <u>Elongation</u>	72°C	45 secondes	
- <u>Elongation Finale</u>	72°C	5 minutes	

Les séquences à amplifier sont déterminées par le choix des amorces ; dans cet essai elles couvrent les régions du gène où les mutations A1142G et C154T sont présentes. Afin d'assurer la conformité des résultats qui seront délivrés à partir de cet ADN, un contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose est effectué, permettant d'évaluer la pureté, l'efficacité et la spécificité de l'amplification. Si une absence d'amplification ou encore une contamination est observée, l'échantillon est éliminé et la PCR reconduite. Ainsi, l'étape de pyroséquençage n'est effectuée que lorsque l'échantillon à analyser est sûr, limitant la perte de réactifs, de matériel et de temps.

- **Mini-séquençage luminométrique**

Principe général

La recherche de mutations sur le gène de l'AGXT est effectuée par un mini-séquençage luminométrique en temps réel ou PyrosequencingTM (Figure 20). Le principe est de séquencer le fragment d'ADN amplifié en synthétisant, à l'aide d'acides nucléiques marqués, son brin complémentaire. L'opération aboutit à un pyrogramme, dont la lecture permet d'identifier la présence d'une mutation ponctuelle ou d'un « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP).

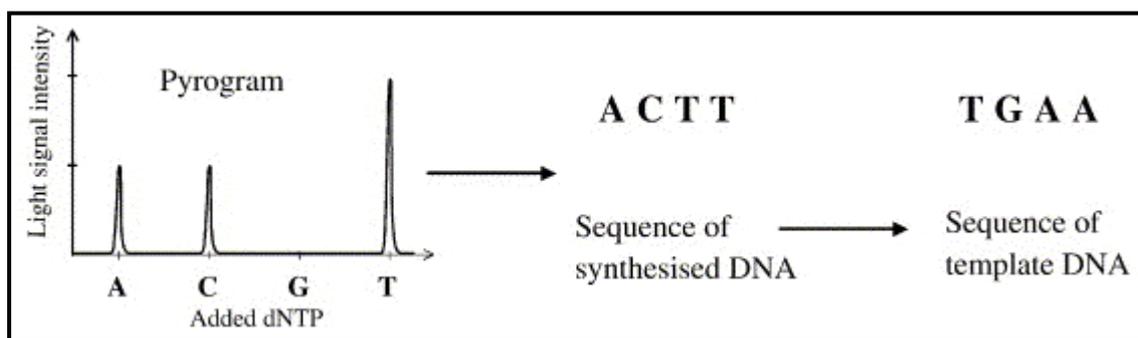


Figure 20 - Interprétation d'un pyrogramme

Etape 1 : Dénaturation de l'ADN

Lorsqu'une congélation préalable des produits amplifiés a eu lieu, ils sont ramenés à température ambiante. Puis, un réactif de fixation dit « Binding Buffer » est introduit dans chaque puits afin de fixer les fragments d'ADN sur des billes de sépharose/streptavidine, par la liaison biotine-streptavidine. Le mélange est laissé 5 minutes à température ambiante, en recouvrant les puits. La fixation des brins d'ADN sur un support solide tel que les billes de sépharose permet de les déplacer successivement dans plusieurs bains de solution, afin de les

purifier puis, dans un deuxième temps, de les dénaturer. Ce transport se fait par capillarité, grâce à un ensemble de 96 capillaires portatifs disposés en « hérisson », aspirant l'ensemble billes-ADN d'une puissance assez importante pour éviter tout décrochement lors du passage à travers les différentes solutions décrites ci-après :

- Une solution d'éthanol à 70%, pendant 5 secondes, afin de purifier l'échantillon
- Une solution de dénaturation « Denaturation Buffer », NaOH à 0.2N, afin de dénaturer l'ADN en le transformant en simple brin
- Une solution de tris-base à pH=7.6, « Washing Buffer », permettant le lavage de l'ADN

Les séquences d'ADN simple brin sont ensuite décrochées des capillaires par une légère agitation du système en « hérisson » et déposées sur une plaque de pyroséquençage, dont les puits contiennent les amorces de séquence nécessaires à la synthèse du brin complémentaire, ainsi qu'une solution d'hybridation dite « Annealing Buffer » composée de Tris-bas et de MgAc₂, et dont le pH est de 7.6. Le support est ensuite incubé à 80°C pendant 2 minutes, puis laissé à température ambiante afin de permettre une hybridation efficace des amorces.

Etape 2 : Hybridation des amorces

L'ADN simple brin est ensuite incubé avec les amorces choisies (Figure 21), les enzymes telles que l'ADN polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciférase et l'apyrase, ainsi que les substrats : l'adénosine 5' phosphosulfate (APS) et la luciférine.

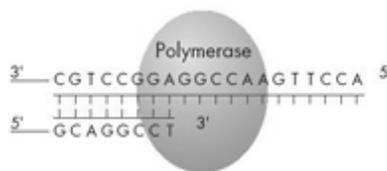


Figure 21 - Hybridation de l'amorce sur l'ADN simple brin (Qiagen 2012)

Mutation	exon	Nom de l'amorce	séquence	biotine	Taille de l'amorce
C154T	1	AGT1up (sens)	5'- CACCAATCCTCACCTCTCAC -3'	non	265 pb
C154T	1	AGT1down (antisens)	5'- TCCTTGCTCATGGACCCG -3'	5'	
A1142G	10	AGT10up (sens)	5'- TCTCACCCACGCACTGAG -3'	non	205 pb
A1142G	10	AGT10down (antisens)	5'- GTTTGTTTCTGCAAAAGG -3'	5'	

Tableau 4 - Description des amorces nécessaires au mini-séquençage luminométrique

Etape 3 : Déroulement du mini-séquençage luminométrique

Les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) sont ensuite ajoutés au milieu, un par un. Lorsque la base azotée est complémentaire à celle de l'ADN du patient, alors l'ADN polymérase catalyse son incorporation au sein du brin synthétisé (Figure 22). Chaque étape d'incorporation d'un nucléotide est associée à la libération d'un pyrophosphate (PPi).

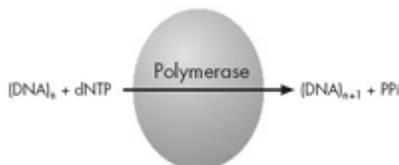


Figure 22 - Incorporation d'un nucléotide par l'ADN polymérase (Qiagen, 2012)

En présence d'adénosine 5'phosphosulfate (APS), l'ATP sulfurylase transforme ensuite l'élément pyrophosphate en ATP. Ce dernier fournit l'énergie nécessaire à la luciférase pour transformer la luciférine en oxyluciférine, générant un signal lumineux visible, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP libérée. Ce signal est détecté par un capteur photographique, dit « charge coupled device » (CCD) permettant de traduire le rayonnement lumineux en signal électrique analogique (Figure 23). La taille de chaque pic présent sur le pyrogramme, représentant l'intensité lumineuse dégagée, est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés.

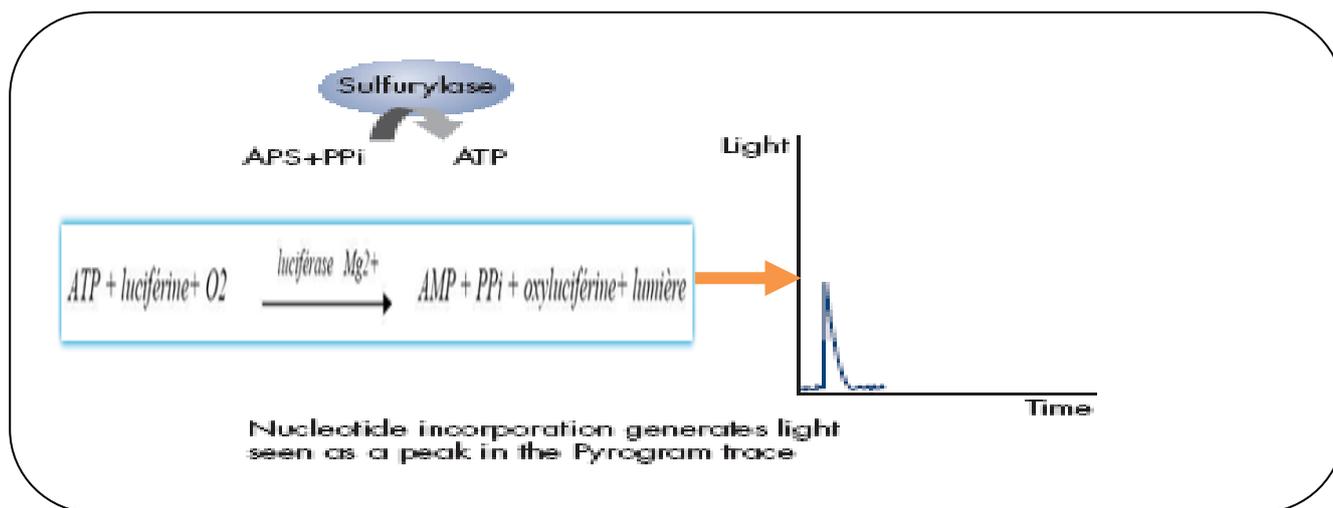


Figure 23 - Traduction de l'intensité lumineuse en un signal électrique interprétable par le pyrogramme (Qiagen 2012)

Tous les nucléotides non incorporés à la séquence, ainsi que l'ATP résiduel, sont dégradés par l'apyrase (Figure 24).

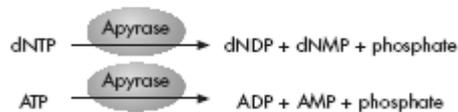


Figure 24 - Dégradation des nucléotides résiduels par l'apyrase (Qiagen, 2012)

L'addition des dNTPs est effectuée de manière séquentielle. Concernant l'adénosine, c'est le déoxyadénosine alfa-thio triphosphate qui (dATP-S) qui est substitué au dATP, puisque celui-ci est reconnu par l'ADN-polymérase mais pas par la luciférase.

- ***Evaluation de la neurotoxicité aiguë***

- ***Examen neurologique***

L'examen neurologique du patient est effectué à chaque cycle d'administration de l'oxaliplatine. Il consiste à évaluer :

- Les réflexes ostéo-tendineux
- La sensation d'effleurement, par un coton passé à la base de l'ongle
- La sensation d'effleurement, par la pointe d'une épingle
- La position des orteils
- La marche et la station debout
- La gêne ressentie lors de l'écriture, le boutonnage, le laçage
- Les signes de pseudolaryngospasme
- Le signe de Lhermitte

L'examen est ainsi renouvelé pendant 9 cycles. Le médecin renseigne un cahier d'observation (*Annexe 6*), dans lequel chaque examen doit être commenté. Il conclut ensuite en indiquant le grade de la neurotoxicité sensorielle ou motrice, selon l'échelle de Levi modifiée (*Annexe 2*). Tout autre effet indésirable est aussi recensé par cet examen.

- ***Questionnaire d'auto-évaluation***

En parallèle, le patient remplit un questionnaire (*Annexe 7*) dans lequel il renseigne tout symptôme, gêne ou effet ressenti, pendant et après l'administration d'oxaliplatine. Ce support est d'un grand intérêt pour l'équipe en charge de l'essai puisqu'elle représente une information très complémentaire de l'examen clinique. Les neuropathies étant difficiles à apprécier, il est indispensable de recueillir le ressenti du patient.

- ***Examen Electrophysiologique***

Afin de préciser les caractéristiques neurophysiologiques de la neurotoxicité aiguë et cumulative, un examen électrophysiologique (EEP) est effectué :

- dans les 24 heures suivant la perfusion d'oxaliplatine à la première cure

- avant (J0) et dans les 24 heures suivant la sixième cure
- avant les 12^{ème} et 18^{ème} cures (semaine précédente)

Les paramètres étudiés lors de l'EEP seront :

- La latence distale (pour les nerfs sensitifs : latence du pic négatif, pour les nerfs moteurs : latence M et F)
- L'amplitude du pic négatif des potentiels d'action. Signaler les potentiels musculaires répétitifs.
- La vitesse de conduction nerveuse.

Les nerfs étudiés sont des nerfs habituellement testés lors d'une EEP de routine.

Nerfs moteurs :

- Médian moteur
- Sciatique poplitée externe (SPE) moteur
- Cubital (1^{er} interosseux dorsal)

Nerfs sensitifs :

- Médian sensitif (méthode antidromique) avec une distance stimulus - réception de 14 cm.
- Radial sensitif (méthode antidromique) avec une distance stimulus - réception de 10 cm.
- Nerf sural (méthode antidromique) avec une distance stimulus - réception de 14 cm.

Etude complémentaire facultative :

Lors de l'EEP, une étude électromyographique de détection à l'aiguille d'un jambier antérieur sera proposée.

Une activité involontaire répétitive d'unité motrice sera recherchée :

- de repos
- de contraction
- de post-activation

Cette étude complémentaire sera réalisée pour 40 patients, au Centre Paul Papin à Angers, promoteur de l'essai. Cet examen est réalisé avant et après le premier et le sixième cycle puis avant le douzième et éventuellement avant le dix-huitième. L'électromyogramme se fait à l'aide d'électrodes collées sur la peau, ne provoque aucune douleur importante et dure environ une heure.

- **Analyse statistique**

- **Descriptif de la base de données**

La base de données de notre étude ancillaire n'inclut que les patients du bras « Placebo » de l'essai Neuroxa, soit uniquement les personnes n'ayant reçu ni calcium ni magnésium au cours du protocole. Afin d'éviter toute confusion lors de la conduite de l'étude, chaque terme employé est précisément défini.

- Neuropathie : Dysesthésie liée au froid, dysesthésie laryngo-pharyngées, paresthésie douloureuse, paresthésie avec gêne fonctionnelle, ataxie sensorielle, déficit musculaire et pseudolaryngospasme, signe de Lhermitte, neurotoxicité, fourmillement, picotement, engourdissement.
- Neuropathie aigüe : Neuropathie le plus souvent provoquée par le froid, survenant dans les heures voire les jours suivant l'administration de l'oxaliplatine, et ce dès les premiers cycles du traitement (< 7 cycles). Elle peut être de grande intensité, mais elle régresse entre deux cycles.
- Neuropathie chronique : Elle survient au minimum après deux administrations d'oxaliplatine, n'est pas liée au froid et ne régresse pas entre deux cycles. En général, elle se déclare suite à accumulation d'oxaliplatine dans l'organisme, le plus souvent vers 6 mois de traitement (12 cycles). Elle peut survenir en toute fin de traitement, d'où l'importance du suivi du patient les semaines suivant la fin de la thérapie.

- **Outils statistiques**

Pour les variables qualitatives, les effectifs ainsi que les pourcentages ont été calculés. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées avec le test du khi-deux ou test de Fisher exact suivant les conditions d'exécution.

Pour les variables quantitatives, la médiane ou la moyenne plus ou moins l'écart type suivant la normalité de la variable, ainsi que les minimums et maximums sont indiqués. Les comparaisons entre les deux groupes ont été effectuées grâce au test non-paramétrique de Wilcoxon.

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) avec un degré de significativité fixé à 5%.

RESULTATS

Dans un premier temps, les informations présentées ci-dessous décrivent brièvement la population incluse dans l'étude ancillaire.

Description de la population

La cohorte représente donc 72 patients, dont la répartition entre hommes et femmes est globalement homogène (*Tableau 5*). Ce critère est seulement descriptif et n'entrera pas ensuite dans l'étude pharmacogénétique. La moyenne d'âge se révèle sensiblement plus jeune que l'âge moyen du diagnostic d'un cancer colorectal, qui est de 70 ans (Institut national du Cancer 2011). Cependant, elle reste tout de même cohérente avec une médiane de 68 ans environ (*Tableau 6*). Elle permet en outre de souligner la précocité du cancer colorectal chez certains patients inclus dans l'étude, et âgés de moins de 45 ans.

Sexe	Fréquence	Pourcentage	Fréquence cumulée	Pourcentage cumulé
F	32	44.4	32	44.4
M	40	55.6	72	100.00

Tableau 5 - Analyse statistique du genre de la population étudiée

N	Moyenne	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum
72	65.5	9.7	67.9	42.9	80.2

Tableau 6 - Age moyen de la population étudiée

Neurotoxicités recensées lors de l'étude

La *Figure 26* montre une stabilité du grade des neuropathies déclarées, et ce tout au long des six premiers cycles du protocole de chimiothérapie. Le caractère aigu est donc particulièrement souligné puisque la toxicité chronique n'est pas représentée ici : le grade de la toxicité ne connaît pas de croissance au fil des cycles. Ainsi, l'hypothèse d'une intolérance « naturelle » à l'oxaliplatine chez certains patients est pertinente.

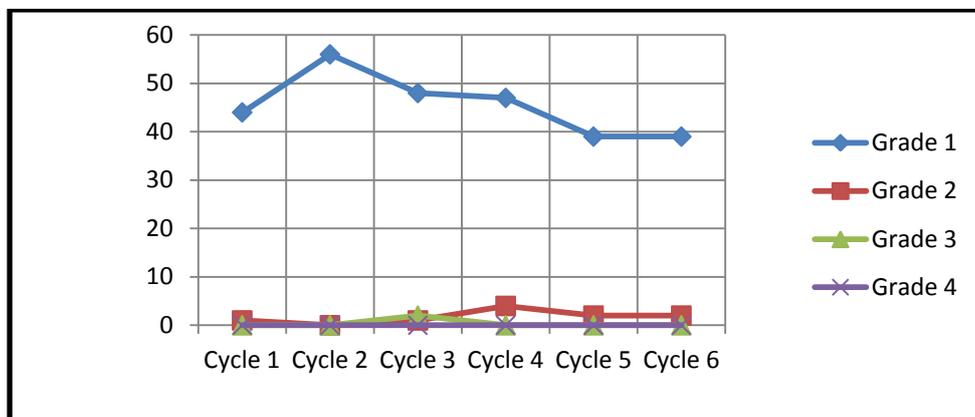


Figure 25 - Pourcentage de patients (N=72) déclarant une neurotoxicité aiguë, selon le grade et le cycle d'administration de l'oxaliplatine

• **Réduction de dose et report de cure pour neurotoxicités aiguës**

Tous les patients inclus dans l'étude Neuroxa ont été suivis régulièrement afin d'effectuer l'examen clinique, mais aussi en vue d'adapter le traitement si besoin. Dans certains cas, comme évoqués ci-dessous (Tableau 7), des mesures ont dû être prises pour soulager le patient, telles qu'une réduction de la dose d'oxaliplatine, voire un arrêt complet du traitement.

	Au moins une mesure de prise	Réduction oxaliplatine	Report de cycle	Arrêt oxaliplatine
N (%)	10 (14,2)	3 (4,3)	-	7 (10,0)

Tableau 7 - Nombre de patients (N=70) ayant eu au moins une mesure de prise à la suite d'une neurotoxicité aiguë et type de cette mesure

Globalement, peu de mesures ont été prises suite aux neurotoxicités aiguës de l'oxaliplatine. Cependant, lorsqu'une telle démarche fut entreprise, l'arrêt du traitement fut la principale réponse employée, pouvant traduire une importante dégradation de la qualité de vie du patient (Figure 26). Les neurotoxicités de grade I n'ont quasiment pas contraint à une intervention particulière ; logiquement, ce sont principalement celles de grade 2 et 3 qui ont nécessité un arrêt. Le grade IV n'est pas exploitable sur ces figures puisqu'aucune neuropathie aiguë de ce grade n'a été recensée.

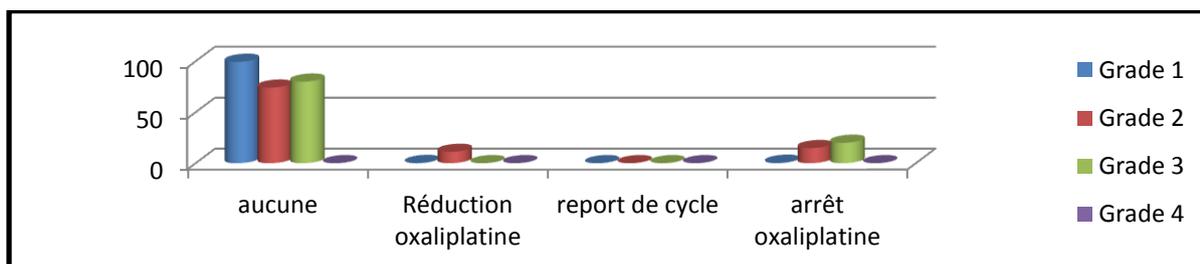


Figure 26 – Nombre de mesures prises, selon leur type, à la suite d'une neurotoxicité aiguë

Description des polymorphismes génétiques au sein de la population étudiée

Le dépistage des mutations n'a été réalisé que sur 46 patients, contre 72 au sein du bras placebo de l'étude Neuroxa. Plusieurs difficultés ont en effet été rencontrées : échantillon d'ADN du patient non conservé, quantité de matière insuffisante, etc. Ce constat est particulièrement lié au caractère rétrospectif de l'étude, exigeant une bonne conservation des prélèvements et un archivage rigoureux.

- **Amplification des ADN génomiques**

En amont du dépistage des mutations par séquençage de l'ADN, les fragments cibles sont amplifiés par PCR. La conformité de la PCR, c'est-à-dire l'amplification spécifique du fragment et l'absence de contamination, est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 27).

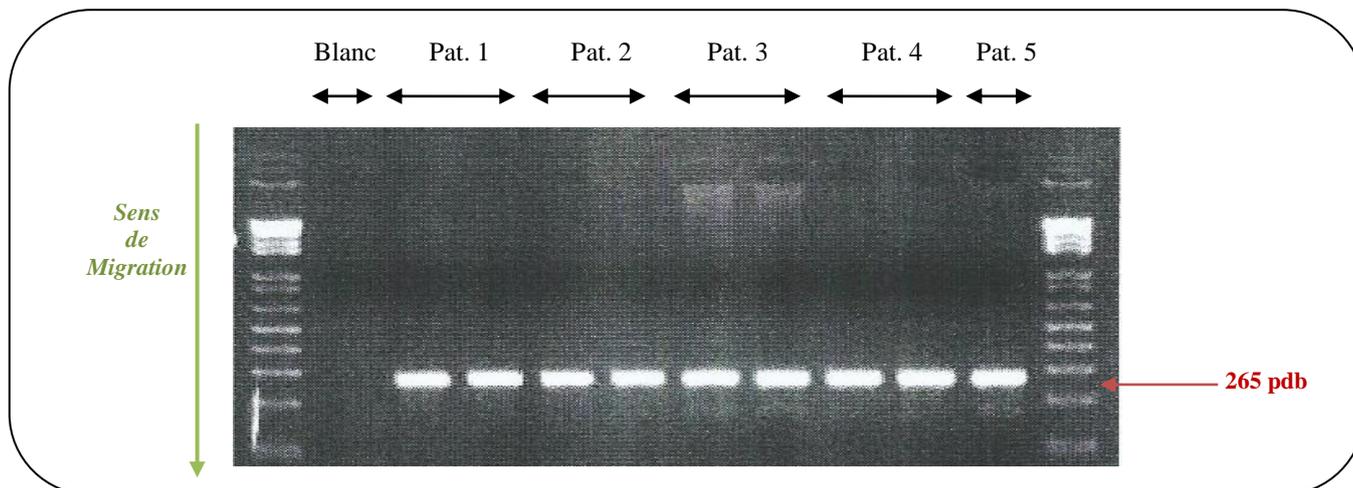


Figure 27 - Résultat observé d'une PCR simplex C154T, sur gel d'agarose à 2%

Pour chaque réaction de PCR, les ADN de trois à quatre patients sont amplifiés simultanément. Afin de réduire la consommation des réactifs et d'optimiser l'utilisation des équipements, les réactions de PCR ont été réalisées en multiplex, signifiant que les deux mutations sont recherchées à partir du même puits d'échantillon : toutes les amorces sont présentes dans chaque puits (Figure 28).

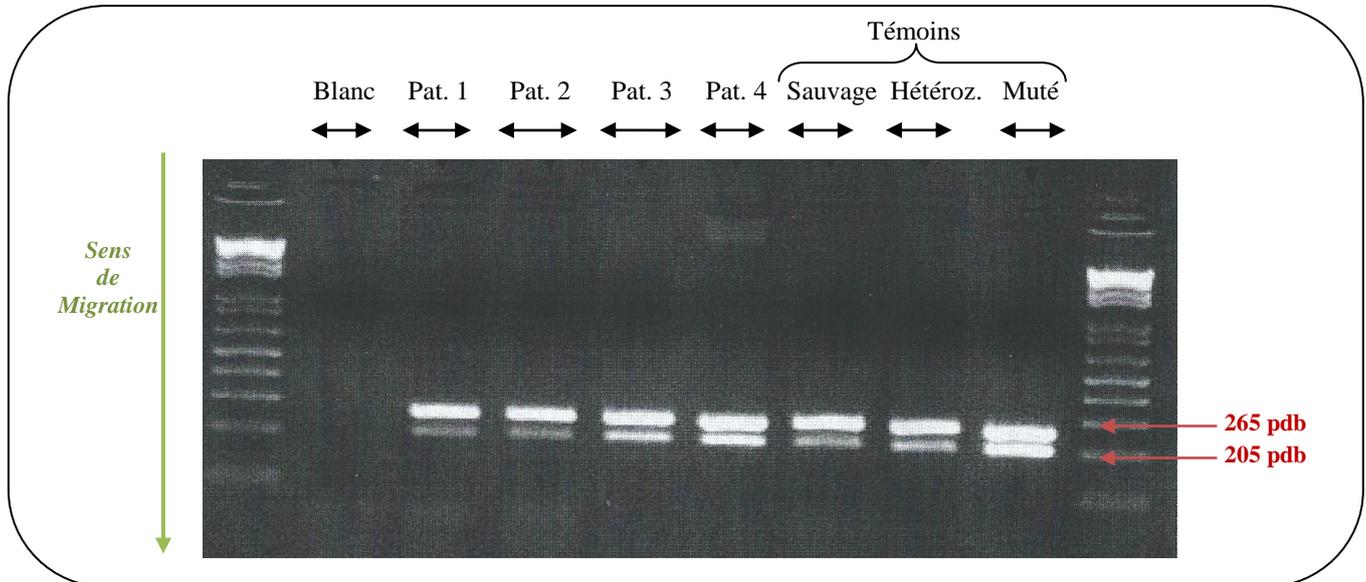


Figure 28 - Résultat observé d'une PCR multiplex C154T et A1142G, sur gel d'agarose à 2%

- **Séquençage de l'ADN par pyroséquençage**

Le dépistage des mutations est effectué par séquençage d'ADN, selon la méthode de pyroséquençage. Le résultat est révélé et interprété par un pyrogramme (*Figure 30*). Afin d'assurer la spécificité et la sensibilité de chaque test, plusieurs témoins doivent être présents, tels qu'un ADN homozygote muté, un ADN homozygote sauvage, un ADN hétérozygote, mais aussi un échantillon dit « blanc ».

Conformément aux opérations de PCR réalisées en multiplex, le pyroséquençage permet de déterminer la présence ou non des deux mutations à partir d'un seul échantillon (*Figure 29*). Le séquençage a été réalisé sur le même nombre de prélèvements amplifiés, soit 46.

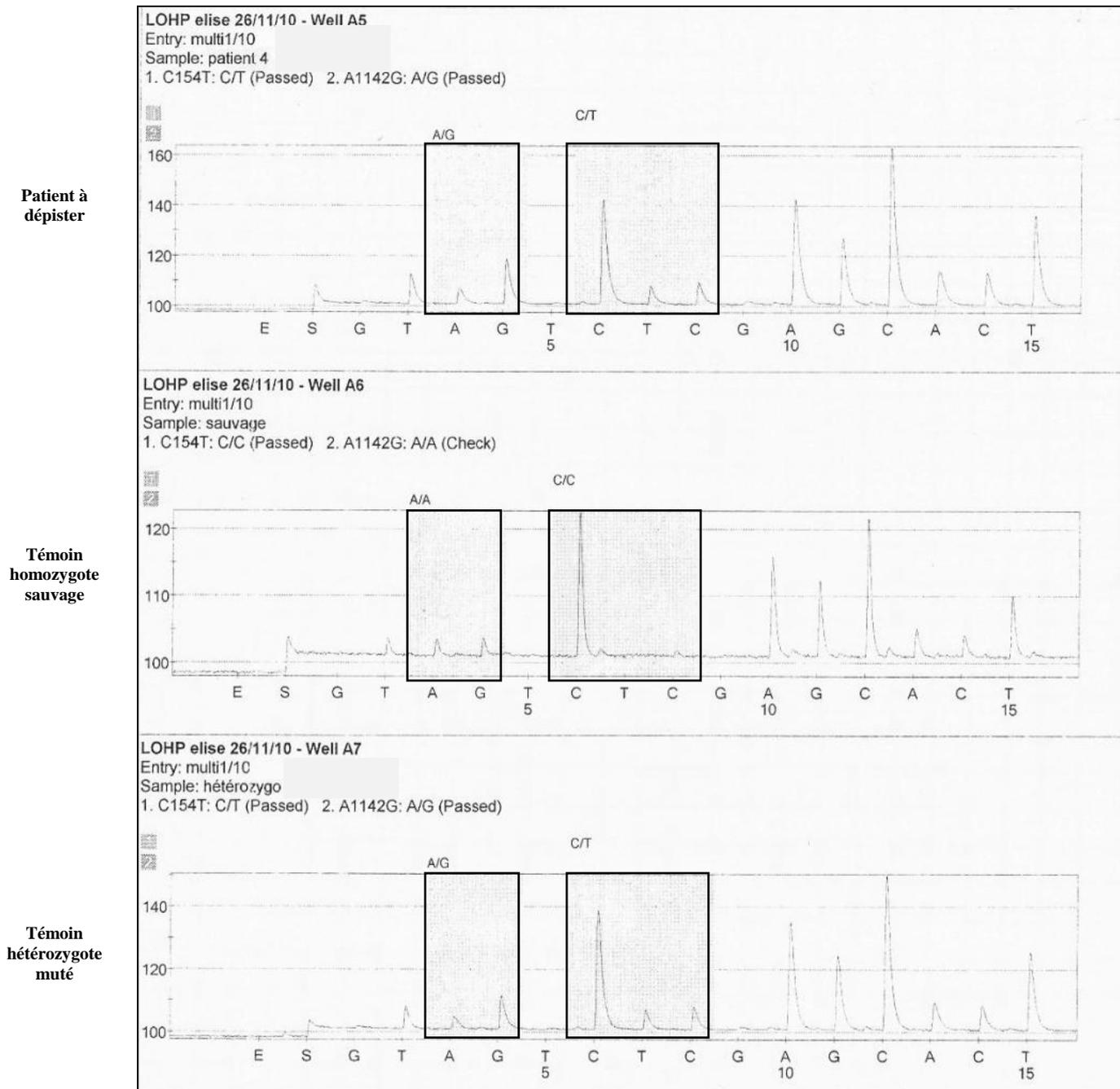


Figure 29 – Exemple de pyrogrammes issus du pyroséquençage en multiplex

- **Pro11Leu**

La mutation Pro11Leu se traduit par la substitution de la base azotée cytosine par la thymine, au niveau du nucléotide 154 (C154T), conduisant à la substitution de l'acide aminé proline par la leucine. Les différents polymorphismes génétiques existants sont :

- C/C : patient homozygote sauvage
- C/T : patient hétérozygote muté
- T/T : patient homozygote muté

<i>Pro11Leu</i>	<i>Fréquence</i>	<i>Pourcentage</i>	<i>Fréquence cumulée</i>	<i>Pourcentage cumulé</i>
C/C	32	69.6	32	69.6
C/T	13	28.3	45	97.9
T/T	1	2.1	46	100.0

Tableau 8 - Répartition de la population selon la mutation Pro11Leu

- *Ile340Met*

La mutation Ile340Met se traduit par la substitution de l'adénine par la guanine, au niveau du nucléotide 1142 (A1142G), conduisant à la substitution de l'isoleucine par la méthionine. Les différents polymorphismes génétiques existants sont :

- A/A : patient homozygote sauvage
- A/G : patient hétérozygote muté
- G/G : patient homozygote muté

Concernant les polymorphismes génétiques, la répartition est conforme à celle de la littérature, soit environ 65% d'homozygotes sauvages et 35% de patients mutés, pour les mutations Ile340Met et Pro11Leu. Malgré le faible effectif de la cohorte, l'échantillon présent est donc cohérent avec la répartition dans la population générale.

<i>Ile340Met</i>	<i>Fréquence</i>	<i>Pourcentage</i>	<i>Fréquence cumulée</i>	<i>Pourcentage cumulé</i>
A/A	30	65.2	30	65.2
A/G	15	32.6	45	97.8
G/G	1	2.2	46	100.0

Tableau 9 - Répartition de la population selon la mutation Ile340Met

Corrélation entre polymorphisme génétique et neurotoxicité

Compte tenu de la très faible proportion d'homozygotes mutés au sein de la cohorte, les ensembles hétérozygotes et homozygotes mutés sont rassemblés. La corrélation n'est étudiée que sur deux ensembles, en recoupant, à l'aide d'outils statistiques, les interprétations des pyrogrammes avec les neurotoxicités recensées au cours de l'essai.

Selon les résultats des tests de corrélation présentés ci-après (*Tableau 10 et 11*), les données ne sont pas exploitables, car les tests ne sont pas significatifs. Par conséquent, aucun lien de cause à effet n'est établi.

- **Pro11Leu**

<i>Toxicité</i>	<i>Observation</i>	<i>T/T et C/T</i>	<i>C/C</i>	<i>P</i>
Courte, quelque soit le cycle d'apparition	Présence	7 (53,8)	15 (48,9)	0,74
	Absence	6 (46,1)	16 (51,6)	
Courte, avant le 6 ^e cycle	Présence	4 (30,7)	11 (35,5)	0,99
	Absence	9 (69,3)	20 (64,5)	
Sortie pour neurotoxicité	Oui	3 (21,4)	13 (40,6)	0,32
	Non	11 (78,6)	19 (59,4)	
Neurotoxicité de grade 3 ou 4, ou laryngospasme	Présence	3 (23,1)	12 (38,7)	0,49
	Absence	10 (76,9)	19 (61,3)	

Tableau 10 - Analyse de la corrélation entre l'apparition de neurotoxicités et la présence la mutation Pro11Leu (C154T)

- **Ile 340Met**

<i>Toxicité</i>	<i>Observation</i>	<i>A/G et G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>P</i>
Courte, quelque soit le cycle d'apparition	Présence	8 (53,3)	14 (48,3)	0,75
	Absence	7 (46,7)	15 (51,7)	
Courte, avant le 6 ^e cycle	Présence	5 (33,3)	10 (35,5)	0,94
	Absence	10 (66,7)	19 (65,5)	
Sortie pour neurotoxicité	Oui	3 (18,7)	13 (43,3)	0,09
	Non	12 (81,3)	16 (56,7)	
Neurotoxicité de grade 3 ou 4, ou laryngospasme	Présence	4 (26,7)	11 (37,9)	0,45
	Absence	11 (73,3)	18 (62,1)	

Tableau 11 - Analyse de la corrélation entre l'apparition de neurotoxicités et la présence la mutation Ile340Met (A1142G)

DISCUSSION

Il est établi que l'oxaliplatine est à l'origine de neurotoxicités conduisant parfois à suspendre voire arrêter le traitement. Les laboratoires pharmaceutiques eux-mêmes sont conscients de la toxicité limitante du produit, indiquant dans la monographie de l'Eloxatine®, une fréquence des neuropathies périphériques chez plus d'un patient sur 10 (Sanofi-Aventis 2011). Cependant, malgré la connaissance de ces effets, il n'existe à ce jour que peu de moyens de prévenir et limiter ces troubles sensoriels. Parmi ceux-ci, l'administration de solutions de calcium et magnésium avant et après une perfusion d'oxaliplatine permet de diminuer l'occurrence de neuropathies ainsi que des arrêts de traitement (L. Gamelin 2004).

L'impact des mutations Pro11Leu et Ile340Met dans l'augmentation d'apparition de neurotoxicités aiguës fut l'hypothèse avancée dans ce travail. Cependant, les conclusions ne permettent pas d'avancer de lien de cause à effet. Une analyse des points forts mais aussi des défauts de l'étude sont développés ci après, afin de proposer une amélioration de la démarche, voire de nouveaux axes de recherche.

Points forts de l'étude

L'étude se base sur des effets largement observés, lors de nombreuses études mais aussi selon les documents fournis par les fabricant d'oxaliplatine. Il existe donc un réel besoin d'améliorer la qualité de vie des patients recevant ce cytotoxique.

- ✓ C'est pourquoi, les équipes de recherche ont pu s'appuyer sur une littérature abondante, rassemblant des explications et hypothèses détaillées sur le mécanisme de toxicité de l'oxaliplatine et de l'oxalate.
- ✓ Mais aussi, la découverte et l'analyse du génome est en plein développement, permettant aux équipes de s'appuyer sur un procédé de recherche de mutations robuste, sensible et reproductible. L'analyse des résultats obtenus permet d'évincer de nombreuses causes telles que les défaillances techniques, de procédés, afin de se concentrer sur la pertinence même de l'objet recherché. *La mutation a-t-elle réellement un impact ? L'effet secondaire recherché est-il pertinent ?*

Concernant le déroulement de l'essai, plusieurs optimisations sont aussi remarquées :

- ✓ L'étude est menée en multicentrique, dans six centres exactement, permettant ainsi d'inclure un nombre plus important de patients dans l'essai. En effet, l'ICO Paul Papin a inclus environ 57% du nombre total des patients ; la démarche multicentrique a ainsi permis de doubler la cohorte.

- ✓ Mais aussi, de nombreuses publications de travaux similaires indiquaient le possible biais causé par l'étude simultanée d'ADN germlinal et d'ADN tumoral. Dans ce travail, seul l'ADN germlinal est analysé, facilitant l'interprétation des résultats puisque les mutations ne dépendent pas du type et/ou de la localisation de la tumeur. De plus, seuls les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique ont été inclus, limitant la diversité des tumeurs.

Défauts de l'étude

Résultats à l'appui, l'étude Neuroxa présente aussi quelques points faibles, voire même certains biais, notamment au niveau du suivi.

- ✓ Selon les résultats décrits précédemment, la répartition des polymorphismes génétiques de l'AGXT selon les mutations étudiées s'est révélée cohérente avec la littérature. Cependant, l'analyse des polymorphismes génétiques a été réalisée sur une cohorte de 47 patients seulement. Malgré l'étude multicentrique, la très faible taille de ce groupe a conduit à la rareté des mutations concernées et, par suite, a rendu difficile l'obtention de résultats significatifs.
- ✓ Malgré l'accroissement de la cohorte permis par le caractère multicentrique, cette démarche peut aussi être à l'origine de certaines difficultés, notamment pour assurer l'homogénéité des pratiques entre les centres. Une organisation et une standardisation strictes des méthodes sont donc nécessaires, de l'inclusion du patient à l'analyse des résultats. Au cours de l'essai Neuroxa, l'évaluation de la neurotoxicité aiguë est un paramètre suffisamment difficile à évaluer pour présenter une source potentielle d'écarts entre les pratiques des différents sites. Contrairement aux informations évoquées dans la partie méthode, le recensement des neuropathies a été réalisé à partir des observations des médecins lors de l'examen neurologique, ainsi que par l'auto-questionnaire fourni au patient. L'examen électrophysiologique (EEP) n'a pas été réalisé. Même s'il est jugé parfois redondant compte tenu des manifestations explicites de certains effets, il est possible que cet écart ait aussi participé à ne pas dépister certaines neurotoxicités aiguës. Les méthodes de détection employées étaient donc très fortement liées aux pratiques du médecin et au ressenti du patient, plus qu'à la robustesse même d'un procédé automatisé. Selon la littérature, l'étude des neuropathies imputables à une substance neurotoxique est le plus souvent réalisée par un examen électrophysiologique voire un électromyogramme (Fournier 2012).
- ✓ Lors de l'analyse des données recueillies par l'examen neurologique, mais aussi par l'auto-évaluation du patient, une différence importante est apparue entre le nombre de

neurotoxicités déclarées par le patient et celui recensé par les médecins. La principale raison peut être la sensibilité des effets recherchés. En effet, l'examen clinique a permis de mettre en avant principalement des troubles sensoriels et moteurs ciblés tels qu'une diminution des réflexes, des troubles de l'écriture, lors du boutonnage, etc. Au contraire, le questionnaire remis au patient interroge sur des troubles sensoriels plus généraux, tels qu'une sensation inhabituelle, des fourmillements, des picotements. Suite au faible nombre d'évènements recueillis par les médecins, l'inventaire des neuropathies aiguës fut complété par les constats des patients. Par conséquent la base de données des effets secondaires fut un ensemble de données qui ne furent pas recueillies de la même manière ; l'imputabilité réelle de certaines toxicités à l'oxaliplatine peut donc être remise en question. Face à ce constat, la réalisation d'un EEP peut être pertinente, afin d'évaluer de manière directe la sensibilité et la capacité nerveuse du patient.

Point sur la littérature

En 2004, une étude publiée par L. Gamelin (L. Gamelin, Gamelin, et Boisdron-Celle 2007) a démontré un lien significatif entre les mutations Pro11Leu et Ile340Met et l'apparition de neuropathies aiguës. Cependant, depuis cette date, plusieurs études ont tenté de confirmer cette corrélation sans y parvenir. Sans remettre en question l'intérêt d'étudier l'impact d'une variation du polymorphisme génétique de l'AGXT, il est possible que les mutations choisies jusqu'à présent ne soient pas celles intervenant dans une prédisposition génétique aux neuropathies périphériques suite à l'administration d'oxaliplatine. Actuellement, les publications relatives aux neuropathies imputables à l'oxaliplatine se concentrent majoritairement vers ERCC1 et GST.

- ✓ ERCC1 fait partie de la famille des gènes de réparation de l'ADN, plus particulièrement des gènes du système Nucleotid Excision Repair (NER), impliqués notamment dans la réparation des adduits à l'ADN créés par les sels de platine. Lors d'une étude sur des patients atteints d'un cancer colorectal et traités par FOLFOX, l'impact du polymorphisme du codon 118 du gène ERCC1 a été évalué (Lecomte, Laurent-Puig, et Lorient 2006). Il s'est avéré que le taux de réponse était significativement meilleur chez les patients ayant un génotype T/T, comparé à celui observé chez les patients ayant un génotype C/T ou C/C. Les résultats ont donc révélé l'impact du polymorphisme génétique du gène codant pour ERCC1 dans la réponse à l'oxaliplatine.

- ✓ Les glutathions S-transférases (GST) sont une famille des gènes impliqués dans la détoxification de nombreux médicaments, notamment des sels de platine. Les gènes

des GST, en particulier GSTM3, GSTM1, GSTP1 et GSTT1, contiennent des polymorphismes constitutionnels liés à des substitutions ou à des délétions, aboutissant à une diminution ou à une abolition de l'activité enzymatique correspondante. L'incidence d'une neurotoxicité cumulative de grade 3 chez 90 patients traités par oxaliplatine était supérieure chez les patients ayant un génotype GSTP1*A/*A comparée à celle observée en cas de génotype GSTP1*A/*B ou GSTP1*B/*B (33% versus 8%; $p=0,02$) (Lecomte, Laurent-Puig, et Lorient 2006). En conclusion, les études pharmacogénétiques menées en 2005 chez les malades traités pour un cancer colorectal ont permis l'identification de nouveaux critères prédictifs de toxicité.

Nouveaux axes de recherche

- ✓ Au sein de l'ICO Paul Papin, de récents travaux ont permis d'étudier la neurotoxicité de l'oxaliplatine, par une approche protéomique. Cette dernière est l'étude du protéome et de ses évolutions (*Figure 30*), et a pour objectif l'analyse du comportement des cellules face à leur environnement (médicament, hormones, température, etc.).

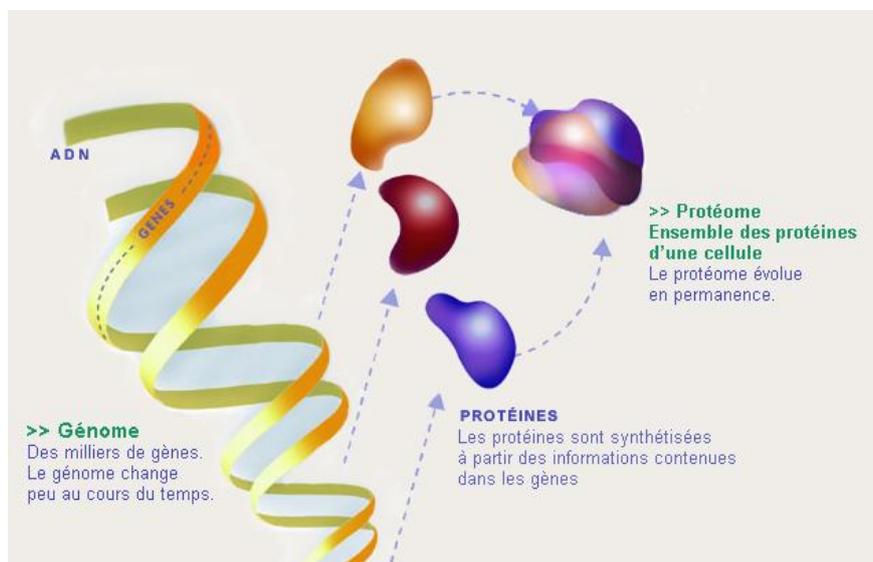


Figure 30 - Interrelation du génome et du protéome (Rechenmann 2005)

Concernant les neuropathies imputables à l'oxaliplatine, l'objectif des travaux est d'obtenir une vision plus globale de la pathogénie, puis de rechercher les biomarqueurs de la neurotoxicité en vue d'une application clinique. Une première étude menée à l'ICO a permis de mettre en évidence, par l'analyse du protéome intracellulaire total des cellules SH-SY5Y, trois protéines plasmatiques modulées par l'oxaliplatine (Mannherz et al, 2009):

- la calmoduline, jouant un rôle dans l'homéostasie calcique
- la thymosine beta-10 impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine
- la neudésine, qui est un neurotrophique

Compte tenu de leur rôle protecteur, la surexpression de ces protéines lors de l'administration du cytotoxique traduit une agression neurologique. Suite à ces observations, une étude protéomique comparative est actuellement menée à l'ICO afin d'évaluer la valeur prédictive de ces protéines, à partir de prélèvements plasmatiques, telle que :

- Prélèvement avant le début du traitement : H0
- A chaque cycle
- A 1 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois après la fin du traitement

Des kits ELISA permettant le dosage des protéines citées dans le plasma humain ont récemment été développés par la société USCN Life Science Inc.

- ✓ Dans le cadre de cette même étude, les voies biologiques impliquées dans le mécanisme d'action de l'oxaliplatine ont été précisées et quelques hypothèses ont pu être avancées, nécessitant d'être vérifiées par des études plus poussées. En accord avec la littérature, et notamment les travaux de Kimura et al (2008), il est avancé que l'oxaliplatine permettrait l'activation par phosphorylation de p38 et ERK ½, associée à une diminution de l'activité de JNK/Scpk (*Annexe 3, 4 et 5*) qui est un neuroprotecteur. Par ce mécanisme, l'oxaliplatine inhibe donc la neuroprotection assurée naturellement par la voie biologique de JNK, exposant le patient aux neurotoxicités. Pour contrer ce phénomène, les facteurs neurotrophiques, dont la neudésine, ont un rôle essentiel puisqu'ils peuvent réactiver, par phosphorylation, le couple JNK/Sapk et ERK ½, et ainsi conduire à une action antiapoptotique des cellules neuronales. La deuxième piste de recherche avancée ici est la corrélation entre une modification de la séquence du gène NENF (Neuron Neurotrophic Factor), codant pour la neudésine, et une diminution de son activité, conduisant à une prédisposition aux neurotoxicités lors d'un traitement par oxaliplatine. Si ce raisonnement est avéré, alors une nouvelle approche pharmacogénétique peut être évaluée afin de dépister les patients prédisposés aux neuropathies imputables à l'oxaliplatine. A ce jour, la littérature réfère déjà une variation du gène NENF: Single Nucleotide Polymorphism 6135608C>G (Putorti 2010). Cependant, aucun phénotype n'est encore associé à ce polymorphisme génétique.

Précautions d'utilisation de la pharmacogénétique

L'approche pharmacogénétique représente de nombreux enjeux scientifiques, comme décrits précédemment, mais aussi éthiques. Ces nouvelles techniques de diagnostic et dépistage traitent des données relatives au génome humain, et dont un mauvais usage peut avoir de graves conséquences sur le choix thérapeutique voire la vie quotidienne du patient. Afin de prendre en compte et de prévenir ces risques de mésusage des méthodes pharmacogénétiques, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) a élaboré un Guide de Bonnes Pratiques de théranostique, incluant quelques approches pharmacogénétiques (Institut national du Cancer, 2010). Ces Bonnes Pratiques rassemblent les paramètres critiques de la méthode, tels que la robustesse, la sensibilité et la reproductibilité, ainsi que les moyens d'y parvenir.

Plus globalement, quelques questions éthiques persistent quant à la portée de la pharmacogénétique. Concernant les patients, certaines dérives de l'approche génétique pourraient conduire à les exclure de certains protocoles thérapeutiques en raison d'un polymorphisme génétique non compatible. A plus long terme, les agences de santé nationales ou même européennes pourraient être amenées à indiquer les polymorphismes génétiques aptes à recevoir un traitement. Poussé à l'extrême, ce raisonnement peut-il conduire des assurances à demander un profil génétique avant toute prise en charge ?

Concernant l'industrie pharmaceutique, là aussi les limites doivent être clairement définies. Les puissantes « Big pharma » ont tout à fait mesuré la portée de ce domaine, afin de rationaliser les traitements qu'elles fabriquent, mais aussi de développer de nouveaux tests de diagnostic. L'importance des résultats révélés par ces tests nécessite que ceux-ci s'adressent au personnel médical et non à des particuliers, afin de posséder les connaissances suffisantes pour l'interpréter convenablement. De plus, la robustesse, la sensibilité et la reproductibilité du test doivent être démontrées afin d'assurer un résultat conforme.

CONCLUSION

Ce travail mené a permis de souligner la nécessité, encore à ce jour, d'améliorer le confort des patients recevant de l'oxaliplatine, notamment par la prévention de ses neurotoxicités. Même si l'hypothèse avancée dans cette étude n'a pas été concluante, de nouvelles pistes, pharmacogénétique et protéomique, sont évoquées afin de prévenir la neurotoxicité. Au travers des nouvelles pistes évoquées, la complémentarité entre l'approche génétique et protéomique s'est révélée essentielle. En effet, l'échelle du protéome a permis d'obtenir une vision plus globale de la pathologie, ciblant ensuite plus facilement les enzymes clés impliquées et, par conséquent, les possibles gènes concernés.

Ces nouvelles approches ont pour objectif l'amélioration du confort du patient par l'adaptation et la personnalisation de son traitement. De nombreuses recherches aujourd'hui portent sur les thérapies personnalisées : dépistage de prédisposition à des effets secondaires, à une réponse augmentée ou bien une non-réponse à un traitement, etc. Les enjeux de cette nouvelle approche de la médecine sont multiples, tels que :

- La diminution des toxicités liées aux traitements
- L'amélioration de l'efficacité des protocoles thérapeutiques
- La rationalisation des coûts associés à ces traitements

Cependant, les nouvelles techniques de personnalisation des traitements doivent être développées dans un cadre bien défini afin de ne pas conduire à des dérives d'exploitation. Les données générées par les méthodes de pharmacogénétique et pharmacogénomique sont telles que la question éthique de leur utilisation doit être perpétuellement présente. Dans le cas contraire, le risque peut être, pour certains patients, l'accès difficile à certains traitements voire même certains essais cliniques, selon leur génotype. Dans certains cas extrêmes avancés par certains professionnels en éthique, un malade pourrait-il être pris en charge aussi facilement en cas de dépistage le qualifiant de « personne à risques » dans le cadre d'un protocole thérapeutique ?

En conclusion, et au travers de l'exemple de l'oxaliplatine, le développement de ces nouvelles technologies de dépistage et thérapeutique est donc essentiel pour l'amélioration du confort du patient, mais aussi pour la rationalisation des soins et de leur coût associé. Mais aussi, la France doit impérativement préciser le cadre de déploiement et d'exploitation de ces nouveaux domaines de diagnostic et de thérapie, afin de prévenir les dérives irréversibles de leur utilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSAPS. 2011. « Cahier d'Acteur: Les biomarqueurs, les produits de santé et l'AFSSAPS ». *ansm*. [En ligne] <http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/%28offset%29/0>.
- Agence Nationale de Sécurité du médicament et des Produits de Santé. 2012. « Résumé des Caractéristiques du Produit ». *Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques*. [En ligne] <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/extrait.php?specid=68086867>.
- Agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie. 2009. « Le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC ». *Institut National du Cancer*. [En ligne] <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancers-du-colon/les-facteurs-de-risque/le-syndrome-de-lynch-ou-syndrome-hnpcc>.
- Asevoaia, A. 2010. « Caractérisation pharmacogénétique des facteurs de résistance et de toxicité de l'Oxaliplatine et de l'Irinotécan dans les tumeurs colorectales ». Thèse de Doctorat: Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université d'Angers.
- Association canadienne du cancer colorectal. 2011. « Le cancer colorectal: Guide de traitement personnalisé à l'intention des patients ». Multimed Incorporated.
- Boige, V. 2006. « Pharmacogénétique du cancer colorectal ». *La Lettre de l'hépatogastroentérologie* IX (3) (avril): 141-142.
- Boige, V., J. Mendiboure, et M.A. Lorient. 2010. « Analyse pharmacogénétique de la toxicité et de l'efficacité de la chimiothérapie chez des patients traités par LV5FU2, FOLVOX et FOLFIRI pour un cancer colorectal métastatique : résultats issus d'une étude randomisée de stratégie thérapeutique ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (15) (mai): 2556-64. doi:10.4267/2042/35623.
- Bouquier, M. 2003. « Place de la Pharmacogénomique dans les Stratégies de Recherche et de Développement des Médicaments: Enjeux Scientifiques, Industriels et Ethiques ». Thèse de Doctorat: Pharmacie, Paris: Paris V.
- Bouvenot, G., et B. Régnier. « Méthodologie des essais thérapeutiques ». *Arcat*. [En ligne] <http://www.arcate-sante.org/essais/annexes/methodologie.html#18>.
- Capitain, O. 2010. « Intensification thérapeutique dans les cancers colorectaux par des études pharmacogénétiques et pharmacogénomiques ». Thèse de Doctorat: Pharmacologie Expérimentale et Clinique, Université d'Angers.
- Centre Paul Papin. 2002. « Protocole Neuroxa, Version 4 ».
- Coriat, R., et S. Chaussade. 2007. « Pour ou contre le phénotypage/génotypage des patients traités par le 5-fluorouracile pour prévenir les effets indésirables ? » *Thérapie* 62 (2) (avril): 105-109.
- Danpure, CJ. 1998. « The molecular basis of alanine:glyoxylate aminotransferase mistargeting: the most common single cause of primary hyperoxaluria type 1. » *Journal of Nephrology*, sect. 11 Supp 1.

- Dufour. 2005. « Module 10 - Cancérologie clinique onco-hématologie ». [En ligne] http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/cancero/module10_item142_231_319.pdf.
- Dumont, A. 2004. « Caractérisation des paramètres d'efficacité et de tolérance de l'oxaliplatine ». Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Angers.
- Durand, JP., C. Brezault, et F. Goldwasser. 2003. « Protection against oxaliplatin acute neurosensory toxicity by venlafaxine. » *Anti-cancer Drugs*, sect. 14.
- Ernoul, E. 2011. « Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine: approche protéomique quantitative ». Thèse de Doctorat: Biologie Cellulaire, Angers: Université d'Angers.
- Facbio. 2012. « Activité Tyrosine Kinase ». *Sciencebio.com*. [En ligne] http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=69&Itemid=94&limit=1&limitstart=3.
- Farinelli, MP., et KE. Richardson. 1983. « Oxalate synthesis from [14C1] glycollate and [14C1] glyoxylate in the hepatectomized rat. » *Biochimica and Biophysica Acta*, sect. 757.
- Feldman, R. G. « Les syndromes cliniques associés à la neurotoxicité ». *International Labour Organization*. [En ligne] http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170077.
- Fournier, E. 2012. « Examen électromyographique et étude de la conduction nerveuse ». *Faculté de médecine Pierre & Marie Curie*. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/neuro/pathoneuro/POLY.Chp.3.html>.
- Gamelin, E., M. Boisdron-Celle, et A. Morel. 2004. « Enzymes du métabolisme de l'irinotécan ». *Eurocancer 2004*.
- . 2005. « Pharmacogénétique du métabolisme des pyrimidines. La dihydropyrimidine déshydrogénase ». *Oncologie 7* (1). *Oncologie (mars)*: 33-39.
- Gamelin, L. 2004. « Caractérisation et prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine ». Thèse de Doctorat: Pharmaco-toxicologie, Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle.
- Gamelin, L., E. Gamelin, et M. Boisdron-Celle. 2003. « Protection de la neurotoxicité de l'oxaliplatine par administration de calcium et de magnésium. »
- . 2007. « Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. » *Clinical Cancer Research*, novembre, sect. 13.
- Garnier, R. 2008. « Toxicité neurologique centrale des solvants organiques ». [En ligne] http://www.centres-antipoison.net/paris/mfw/2008/TRG_84_effets_neurotoxiques_RG_MFW_20080624.pdf.
- de Gramont, A., A. Figer, et M. Seymour. 2000. « Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. » *Journal of Clinical Oncology*, sect. 18.

- Grolleau, F., E. Gamelin, et M. Boisdron-Celle. 2001. « A Possible Explanation for a Neurotoxic Effect of the Anticancer Agent Oxaliplatin on Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels ». *Journal of Neurophysiology*, sect. 85.
- Haute Autorité de Santé. 2007. « Prise en charge diagnostique des neuropathies périphériques (polyneuropathies et mononeuropathies multiples) ». Service des Recommandations Professionnelles.
- . 2008. « Guide ALD 30 “Cancer colorectal” ». Haute Autorité de Santé.
- Institut national du Cancer. 2010. *Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique des mutations somatiques dans les tumeurs solides*. Mesure Plan Cancer.
- . 2011. « Epidémiologie du Cancer Colorectal ».
- Huriez, A. 2011. « Etat des lieux des biomarqueurs comme outil de diagnostic compagnon de produits thérapeutiques ». [En ligne] http://www.gipso.org/documents/4d0b922902422_alainhuriezpdf.pdf.
- Kanai, M., T. Nishimura, et S. Matsumoto. 2012. « Associations between glutathione S-transferase pi Ile105Val and glyoxylate aminotransferase Pro11Leu and Ile340Met polymorphisms and early-onset oxaliplatin-induced neuropathy ». *Cancer Epidemiology* 34 (2). Elsevier (avril): 189-193.
- Lecomte, T., P. Laurent-Puig, et M.A. Lorient. 2006. « Pharmacogénétique en hépato-gastroentérologie » 13 (4). *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* (août): 275-87.
- Lelièvre, A. 2010. *Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval*. La lettre de l'hépto-gastroentérologue.
- Lersch, C., R. Schmelz, et F. Eckel. 2002. « Prevention of oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy by carbamazépine in patients with advanced colorectal cancer. » *Clinical Colorectal Cancer*, sect. 2.
- Lloyd, C., et T. Payton. 2011. *Alanine : Glyoxylate Aminotransferase and the Effects of its Mutations*. Berea: Berea college.
- Mégarbane, B. 2003. « Intoxication aiguë par l'éthylène glycol ». *Orphanet*. [En ligne] <https://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-glycol.pdf>.
- Nuhrich, Alain. 2008. « Médicaments antitumoraux dérivés du Platine ». Enseignement de Chimie Thérapeutique octobre. [En ligne] http://frontal.univ-angers.fr/unsfp/2008_Bordeaux_Nuhrich_M%C3%A9dicaments_Antitumoraux/co/antitumoraux_web-etu.html.
- OMS. 1995. *Comité OMS d'experts sur la sélection et l'utilisation des médicaments essentiels*. Série de Rapports techniques.
- . 2012. « OMS | Médicaments: sécurité et effets indésirables ». [En ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs293/fr/index.html>.
- Putorti, M. L. 2010. *Caractérisation clinique et génétique d'une famille canadienne-française atteinte de la neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie*. Montréal: Université de Montréal.
- Qiagen. 2012. « The principle of Pyrosequencing technology ». *Qiagen*. [En ligne] <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454>.

- Rechenmann, François. 2005. « Interstices - La bioinformatique en protéomique : analyse des spectres de masse ». http://interstices.info/jcms/c_7463/la-bioinformatique-en-proteomique-analyse-des-spectres-de-masse?part=0.
- Sanofi-Aventis. 2011. « Monographie de Produit - Eloxatin ».
- Silbergeld, E. K. « L'approche américaine de l'évaluation du risque des toxiques pour la reproduction et des agents neurotoxiques ». *International Labour Organization*. [En ligne] http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170403.
- Wilson, RH., T. Lehky, et RR. Thomas. 2002. « acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. » *Journal of Clinical Oncology*, sect. 20.

ANNEXES

Annexe 1- Classification de l'état général du patient selon les indices de l'OMS et Karnofski (Dufour, 2005)

T → Tumeur primitive	
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signes de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculéuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques et péirectaux non péritonéalisés
T4	T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
N → Adénopathies régionales	
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoraux, c-à-d satellite(s) dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non péritonéalisés péricoliques ou péirectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastase dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
M → Métastases à distance	
M0	Pas de métastases à distance
M1a	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Annexe 2 - Classification TNM 2009 du cancer colorectal, par l'American Joint Committee on Cancer, (Haute Autorité de Santé 2008)

ETAT GENERAL	Index OMS	Index Karnofski
Normal, pas de douleur Aucun signe de la maladie	0	100
Possibilité de mener une activité normale : signes ou symptômes mineurs de la maladie	0	90
Possibilité de mener une activité normale avec efforts quelques signes ou symptômes de la maladie	1	80
Incapacité de mener une activité normale ou de travailler	2	70
Nécessité d'une aide occasionnelle	2	60
Nécessité d'une aide importante et assistance médicale	3	50
Incapacité : nécessité de soins spéciaux et d'assistance	3	40
Incapacité sévère nécessitant l'hospitalisation	4	30
Grabataire	4	20
Phase terminale	4	10
Décès	5	0

Annexe 2 - Echelle spécifique de neurotoxicité de l'oxaliplatine (échelle de Levi modifiée)
(Centre Paul Papin 2002)

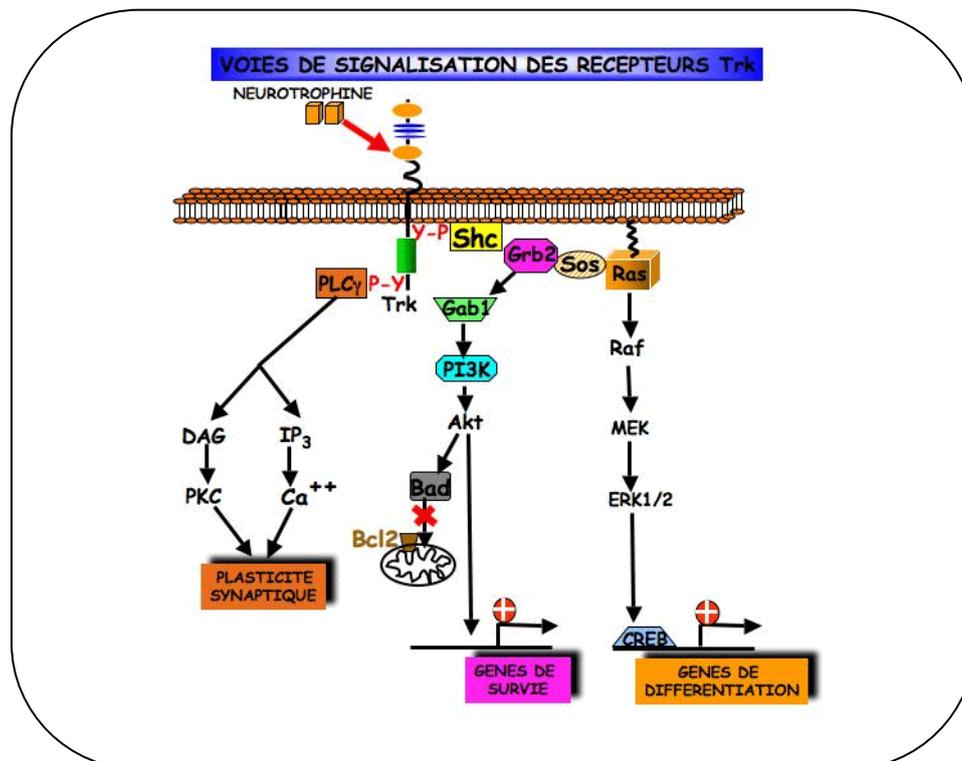
Grade 0 : pas de symptôme

Grade 1 : paresthésies, dysesthésies de courte durée, avec régression complète avant le cycle suivant

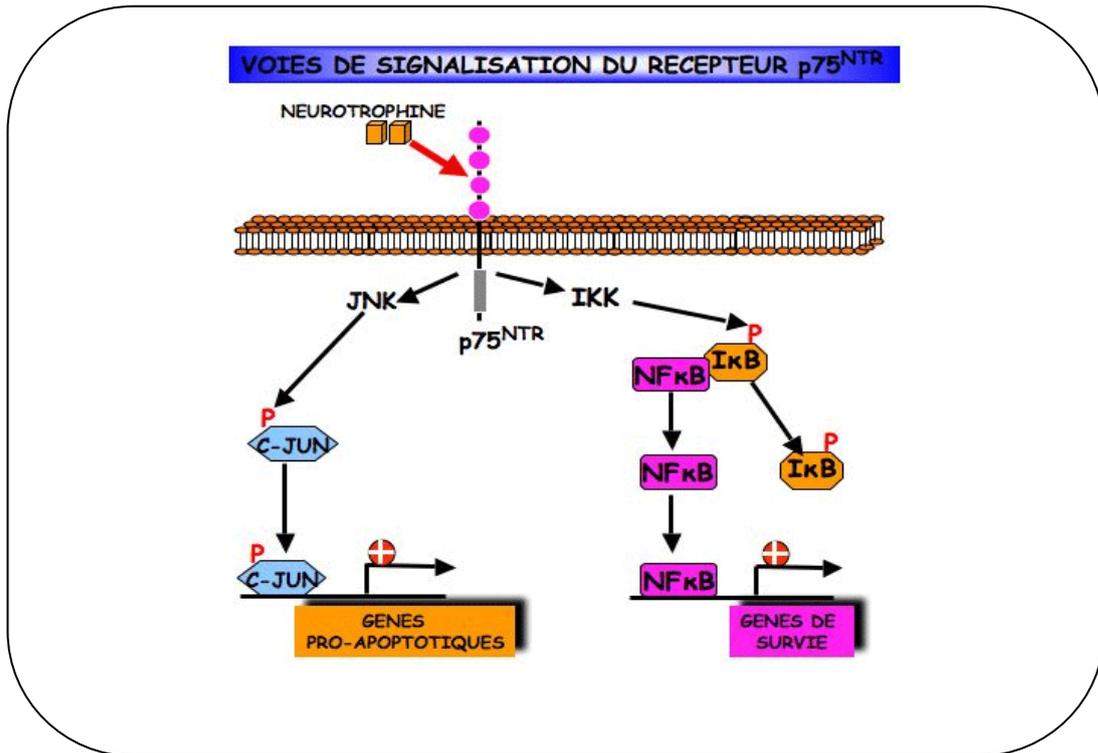
Grade 2 : paresthésies, dysesthésies persistant entre 2 cycles sans gêne fonctionnelle

Grade 3 : gêne fonctionnelle persistante

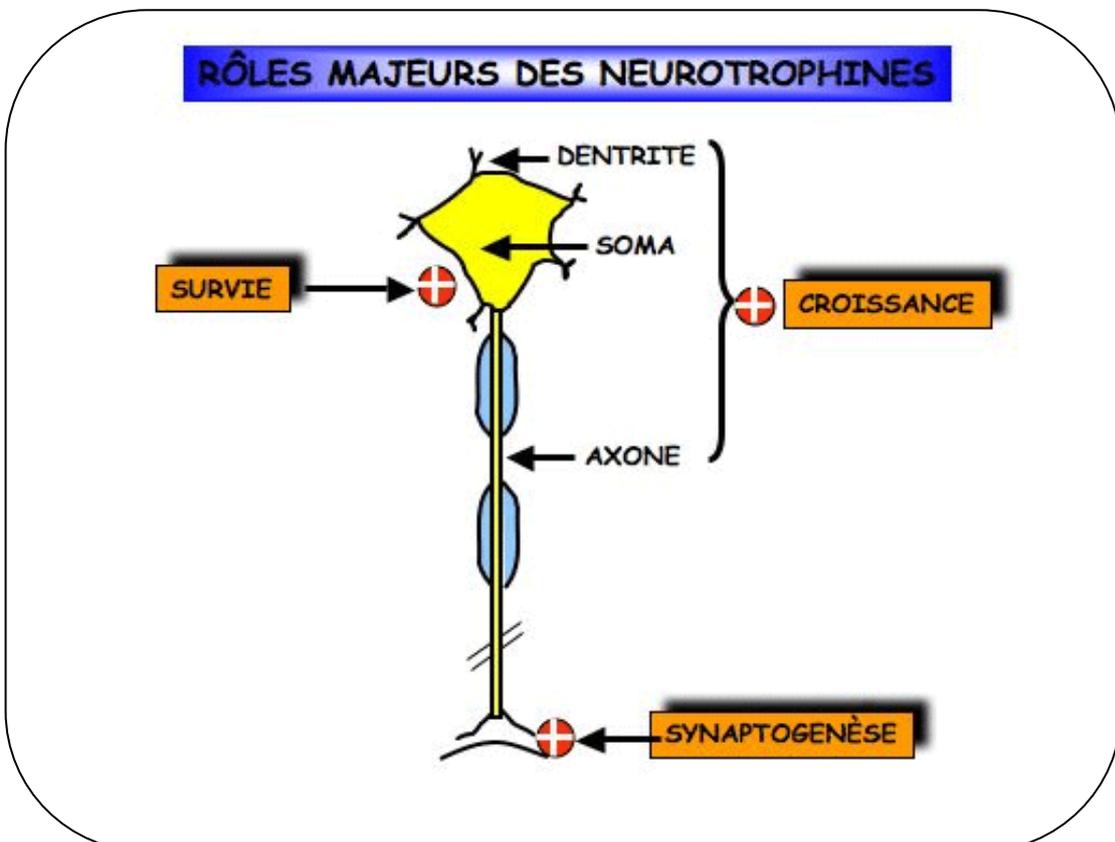
Annexe 3 - Voies de signalisation des récepteurs Trk (Facbio 2012)



Annexe 4 - Voie de signalisation du récepteur p75^{NTR} (Facbio 2012)



Annexe 5 - Rôles majeurs des neurotrophines (Facbio 2012)



Annexe 6 – Ensemble des tests constituant l'examen neurologique effectué lors de l'étude Neuroxa (Centre Paul Papin 2002)

REFLEXES OSTEO-TENDINEUX :	Normal	Diminué	Disparu	Augmenté	Non fait
ACHILLEEN	<input type="checkbox"/>				
ROTULIEN	<input type="checkbox"/>				
STYLO-RADIAL	<input type="checkbox"/>				
BICIPITAL	<input type="checkbox"/>				
TRICIPITAL	<input type="checkbox"/>				

SENSATION D'EFFLEUREMENT PAR COTON A LA BASE DE L'ONGLE	Normale	Non perçue	Non fait
DE L'INDEX	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DU GROS ORTEIL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

POINTE D'UNE EPINGLE	Contact perçu	Diminué	Non perçu	Non fait
DE L'INDEX	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DU GROS ORTEIL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

POSITION DES ORTEILS Position perçue Position non perçue Non fait

MARCHE ET STATION DEBOUT	Normal	Anormal	Non fait
MARCHE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MARCHE SUR LA POINTE DES PIEDS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MARCHE SUR LES TALONS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MARCHE ALTERNEE TALONS/POINTES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ROMBERG (YEUX OUVERTS)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ROMBERG (YEUX FERMES)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
STATION DEBOUT ET POSITION ACCROUPIE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

GENE RESSENTIE POUR	Aucune	Faible	Modérée	Importante	Non fait
ECRITURE	<input type="checkbox"/>				
BOUTONNAGE	<input type="checkbox"/>				
LAÇAGE	<input type="checkbox"/>				

PSEUDOPSEUDOLARYNGOSPASME : Oui Non

Si oui : Date de survenue : |__|_| |__|_| |__|_| |__|_| Durée : |__|_| minutes

Décision d'allongement du temps de perfusion : Oui Non

Traitement correcteur : Oui Non

Si oui, préciser :

SIGNE DE LHERMITTE : Oui Non

Si oui : Date de début : |__|_| |__|_| |__|_| |__|_|

Si oui : Date de fin : |__|_| |__|_| |__|_| |__|_| persistant

Annexe 7 - Questionnaire d'auto-évaluation rempli par le patient (Centre Paul Papin 2002)

AUTO-QUESTIONNAIRE
EN PERIODE DE TRAITEMENT PAR OXALIPLATINE

Date |__|__| |__|__|__| |__|__|__|__| **Nombre de cures de chimiothérapie réalisées:**
|____|
jour mois année

1. Fatigue

Vous êtes-vous senti(e) fatigué(e) depuis la dernière administration de la chimiothérapie ? Oui
Non

Si oui, l'intensité de la gêne ressentie était : faible modérée importante intense

Moment d'apparition de la fatigue par rapport à la perfusion d'oxaliplatine :

Encours de perfusion Après la perfusion

Si après perfusion, délai d'apparition de la fatigue après la perfusion d'oxaliplatine :

.....Minutes.....heures.....jours

2. Sensations

Avez-vous senti des sensations inhabituelles (sensibilité diminuée ou anormale) ? Oui Non

Si oui, à quels niveaux ?

Doigts Mains Orteils Pieds Langue Lèvres Visage

Autre, précisez :

Gêne occasionnée par ces sensations inhabituelles, selon le type :

	Si oui, intensité			
	Faible	Modérée	Importante	Intense
Picotements/fourmillements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diminution de la sensibilité/engourdissement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Douleurs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Contractures musculaires sans douleurs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crampes, contractures musculaires douloureuses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre, préciser :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Ces sensations inhabituelles sont-elles déclenchées ou aggravées par le froid :

Non Déclenchées Aggravées

Moment d'apparition de ces sensations par rapport à la perfusion d'oxaliplatine :

En cours de perfusion Après perfusion

Si après perfusion, délai d'apparition de ces troubles après la perfusion d'oxaliplatine :

.....Minutes.....heures.....jours

Durée globale (maximale) des troubles :

.....Minutes.....heures.....jours

Annexe 7 (suite) - Questionnaire d'auto-évaluation rempli par le patient (Centre Paul Papin 2002)

3. Mouvements

Avez-vous ressenti des troubles lors de vos mouvements ? Oui Non

Si oui, l'intensité de la gêne ressentie selon le type de trouble était:

Type	Intensité			
	Faible	Modérée	Importante	Intense
Gêne pour marcher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gêne pour boutonner vos vêtements ou lacer vos chaussures	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gêne pour écrire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gêne pour saisir des objets	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gêne pour rester en station debout	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diminution de la force musculaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Moment d'apparition de ces sensations par rapport à la perfusion d'oxaliplatine :

En cours de perfusion Après perfusion

Si après perfusion, délai d'apparition de ces troubles après la perfusion d'oxaliplatine :

.....Minutes.....heures.....jours

Durée globale (maximale) des troubles :

.....Minutes.....heures.....jours

Avez-vous ressenti d'autres anomalies relativement aux mouvements ? Oui Non

Si oui, décrivez en clair ces anomalies (types, intensité, délai d'apparition, durée) :

.....
.....

4. Diarrhée

Avez-vous eu de la diarrhée ? Oui Non

Si oui quand a eu lieu cette diarrhée ? En cours de perfusion après perfusion

Si après perfusion, délai d'apparition de ces troubles après la perfusion d'oxaliplatine :

.....Minutes.....heures.....jours

Nombre de selles par jour en moyenne : |____|

Durée globale (maximale) des troubles :

.....Minutes.....heures.....jours

Signature du patient :

Elise COURCAULT

Prévention des effets secondaires de l'oxaliplatine par une approche pharmacogénétique

Résumé

L'oxaliplatine est un agent anticancéreux à marge thérapeutique étroite, principalement administré en traitement d'un cancer du colon, du rectum ou du pancréas, et dont la toxicité limitante est une neuropathie périphérique. En vue de prévenir cet effet indésirable, nous avons étudié la possible corrélation entre la présence des mutations A1142G et C154T sur le gène codant l'alanine:glyoxylate aminotransférase (AGXT), et l'apparition de neurotoxicités périphériques au cours d'un traitement par oxaliplatine. Un déficit fonctionnel de cet enzyme qui transforme le glyoxylate en glycine, conséquence possible des mutations citées précédemment, pourrait engendrer une accumulation d'oxalate dans l'organisme et, par suite des neurotoxicités aiguës. Les résultats obtenus lors de cette étude n'ont pas permis d'établir un lien significatif entre ces deux phénomènes. Cependant, le caractère subjectif de l'évaluation des neuropathies fut souligné, traduisant la nécessité d'un examen neurologique précis voire d'un électromyogramme, mais aussi l'intérêt des travaux de protéomique en amont de l'approche pharmacogénétique.

Mots clé : pharmacogénétique, oxaliplatine, neuropathies périphériques, neurotoxicité aiguë, pyroséquençage, oxalate, mutations génétiques

Preventing patients from side effects of oxaliplatin by oncogenetic approach

Abstract

Oxaliplatin is an antineoplastic drug with a narrow therapeutic window, mostly used in the treatment of rectum, colon or pancreas cancer, and which often lead to peripheral neurotoxicity. In order to prevent from this side effect, we have studied the hypothetic correlation between mutations A1142G and C154T on Alanine:Glyoxylate aminotransferase gene, and onset of neuropathies. A functional deficiency of this enzyme which is responsible of the transformation of glyoxylate to glycin, induced by these genetic mutations, would result in an accumulation of oxalate and, then, in the occurrence of neurotoxicity. Conclusions of this study did not demonstrate any significant link between these two phenomenons. Nonetheless, subjectivity of neurotoxicity evaluation was hardly shown, resulting in requirement of accurate neurologic examination, even an electromyography. Also, proteomic approach seems to be very useful upstream to pharmacogenomics.

Keywords: pharmacogenetics, oxaliplatin, peripheral neuropathy, acute neurotoxicity, pyrosequencing, oxalate, genetic mutations