

# LES THÉRAPIES CIBLÉES DE LA RÉPONSES AUX DOMMAGES DE L'ADN DANS LE TRAITEMENT DU CANCER : L'EXEMPLE DU VX-970

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ..... p10

INTRODUCTION ..... p15

### Partie I : LES THÉRAPIES CIBLÉES EN ONCOLOGIE

#### A. ÉTATS DES LIEUX

1. Les données chiffrées .....p20

- a. L'utilisation des thérapies ciblées en France
- b. Les indications des thérapies ciblées

2. La classification .....p32

- a. Historique
- b. Classification de l'Institut National du Cancer
- c. Classification établie par Enrique et al.
- d. Proposition d'une classification

3. Les succès thérapeutiques .....p39

- a. Le trastuzumab dans le cancer du sein HER2+
- b. L'imatinib dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique
- c. Les anti-angiogéniques dans le cancer du rein métastatique
- d. Les thérapies anti-EGFR et anti-ALK dans le cancer bronchique non à petite cellule.
- e. L'immunothérapie et inhibiteurs BRAF dans le traitement du mélanome métastatique

## **B. LIMITES ET ENJEUX**

### **1. Les résistances acquises.....p58**

- a. Les mécanismes génétiques
- b. Les mécanismes non génétiques

### **2. La toxicité.....p68**

- a. Toxicités cardio-vasculaires
- b. Toxicités cutanéomuqueuses
- c. Toxicités digestives
- d. Troubles respiratoires
- e. Toxicités rénales
- f. Toxicités médullaires
- g. Troubles métaboliques et endocriniens
- h. Troubles biologiques & généraux

### **3. Le coût .....p75**

- a. Historique
- b. Les chiffres en France (2012-2014)
- c. Problématiques actuelles

## **C. LES PERSPECTIVES EN IMMUNO-ONCOLOGIE**

### **1. L'immunothérapie spécifique .....p82**

### **2. Les CAR-T .....p89**

## **Partie II : LA RÉPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN (DNA DAMAGE RESPONSE)**

### **A. ORIGINES ET DOMMAGES DE L'ADN**

#### **1. Les facteurs endogènes .....p92**

- a. Processus chimiques
- b. Processus biologiques

#### **2. Les facteurs exogènes.....p94**

- a. Facteurs physiques
- b. Facteurs chimiques
- c. Agents pathogènes

#### **3. Les dommages de l'ADN .....p96**

- a. Les modifications de la structure d'ADN
- b. Les cassures d'ADN

## **B. LES MÉCANISMES DE RÉPARATIONS DE L'ADN**

### **1. Mécanismes généraux.....p99**

### **2. Le système ATR- ATM- DNA-PK.....p102**

- a. La voie ATM
- b. La voie ATR
- c. Dialogue croisée et travail commutatif ATR-ATM
- d. La voie DNA-PK

### **3. Le couplage avec les systèmes de réparations de l'ADN .....p112**

- a. Réparation des dommages simple brin de l'ADN
  - i) La réparation par excision de bases (BER)
  - ii) La réparation par excision de nucléotides (NER)
  - iii) La réparation des mésappariements des bases (MMR)
- b. Réparation des dommages double brin de l'ADN
  - i) La réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)
  - ii) La recombinaison homologue (HR)
  - iii) La coordination des mécanismes de réparations double brin

## **C. LE CIBLAGE DES MÉCANISMES DE RÉPARATION**

### **1. Les implications historiques de la DDR.....p130**

- a. Troubles du développements et maladies congénitales
- b. L'exploitation thérapeutique des anomalies de la DDR
- c. La résistance aux cytotoxiques

### **2. Rationnel du ciblage de la DDR dans la cellule tumorale.....p134**

- a. La perte d'une ou plusieurs voies de la DDR
- b. L'augmentation du niveau d'agression endogène de l'ADN
- c. Une augmentation du niveau de stress réplicatif

### **3. Applications .....p139**

- a. L'olaparib, inhibiteur de la protéine PARP
- b. La combinaison des inhibiteurs de la DDR avec les agents endommageant l'ADN
  - i) Chimiothérapie
  - ii) Radiothérapie
- c. Apport de l'aspect computationnel dans l'exploration des défauts de la DDR
  - i) Constriction d'un modèle mécanistique de la DDR
  - ii) Calibration du modèle à l'aide d'expérience in vivo
  - iii) Evaluation de la contribution d'ATM et de la DNA-PK dans la phosphorylation des histones H2AX.

- d. Rationnel du ciblage de la voie ATR-Chk1
- e. Les inhibiteurs ATR
- f. Les études précliniques du VX-970

### Partie III : DÉVELOPPEMENT DU PREMIER INHIBITEUR DE LA PROTÉINE ATR : LE VX-970

A. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DE L’ESSAI CLINIQUE DE PHASE I « FIRST-IN-HUMAN » DU VX-970.....	p161
B. MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE PAR UNE MÉTHODE DE POPULATION .....	p166
C. VALIDATION D’UNE MÉTHODE ANALYTIQUE DE DOSAGE DU VX-970 DANS LE PLASMA HUMAIN PAR LC-MS/MS.....	p172

CONCLUSION .....	p178
------------------	------

BIBLIOGRAPHIE.....	p181
--------------------	------

### ANNEXES

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	I
PUBLICATION.....	II
SPECTRES DE MASSE .....	III
SERMENT DE GALIEN.....	IV

# INTRODUCTION

Les quinze dernières années ont vu naître un tournant majeur dans la prise en charge thérapeutique du cancer avec une transition des agents cytotoxiques à large spectre et à index thérapeutique étroit vers des thérapies hautement ciblées à effets synergiques et/ou additifs.

Par leur nature, les thérapies ciblées (TC) ne visent pas la cellule tumorale directement comme c'est le cas de la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle. Elles ciblent les mécanismes communs impliqués dans l'oncogenèse comprenant la transformation, la prolifération, et la propagation des cellules tumorales. Ces phénomènes décrivant la cancérogenèse sont la résultante de huit nouvelles propriétés que la cellule tumorale acquiert lors de sa transformation. Elles ont été décrites par Robert Weinberg et al. dans la publication « The hallmarks of cancer : Next generation » [1] :

- L'activation constitutive de signaux de prolifération,
- L'instabilité génétique et l'immortalité répllicative (via les télomérases),
- La neutralisation de régulateurs négatifs du cycle cellulaire
- La perte de sensibilité aux signaux d'apoptose,
- L'échappement à la réponse immunitaire,
- L'angiogenèse tumorale et une activité pro-inflammatoire,
- Une mobilité accrue et l'induction de métastase,
- Une reprogrammation du métabolisme énergétique,

Des altérations génétiques et moléculaires, issues des phénomènes de translocations, d'amplifications géniques spécifiques ou de mutations activatrices, confèrent à la cellule tumorale une ou plusieurs de ces propriétés et constituent des cibles thérapeutiques potentielles. Ces thérapies utilisent une compréhension à l'échelle moléculaire de la physiopathologie cancéreuse propre à chaque type de patient. C'est cette approche qui est à la base du concept de médecine personnalisée ou médecine de précision [2] et qui a apporté de nombreuses révolutions

thérapeutiques dans certains cancers. C'est le cas de l'imatinib, le premier inhibiteur enzymatique de récepteur à activité Tyrosine-Kinase (ITK) qui marqua un bouleversement dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique en 2001, (95.5 % de réponse hématologique complète vs. 55 % avec le traitement référent Interféron  $\alpha$  + Ara-C, étude IRIS) [3]. Depuis ce succès, les efforts de la recherche dans le domaine des TC, ont drastiquement augmenté ces dix dernières années jusqu'à représenter 80% des nouvelles AMM en cancérologie en France, en 2012 (rapport de l'ANSM, 2012 [4]). Fin 2015, un médicament anticancéreux sur quatre appartient à la classe des TC. [5]

Cette orientation de la recherche pharmaceutique mondiale a largement participé à la découverte de nouvelles cibles, en constante augmentation à l'heure actuelle. Elle a permis également de confirmer le statut d'anomalie génétique et/ou épigénétique de la maladie cancéreuse (mutation activatrice d'un oncogène ou inhibitrice d'un gène suppresseur de tumeur) ce qui a considérablement modifié les classifications nosologiques des maladies néoplasiques. D'après la publication « Tumors outside the mutation box » [6] il est possible d'identifier au moins une altération génétique ou épigénétique somatique dans la presque totalité des cancers. Ceci a pour conséquence de donner une importance particulière à l'identité biologique qui vient s'associer à l'aspect anatomopathologique de la tumeur. Cette identité déterminée par le séquençage du gène cible ou par le dosage de biomarqueurs va définir à la fois la stratégie thérapeutique à adopter ainsi que le pronostic de la maladie. De plus, cette identité n'est pas homogène au sein de la tumeur. Cette hétérogénéité résultant de l'accumulation au cours du temps, de diverses mutations somatiques aléatoires, va conduire à l'émergence de sous-clones au potentiel agressif ou sensible en fonction du type de mutations subit. Ce phénomène de polyclonalité dynamique intra-tumorale est à la base de la recherche de nouvelles stratégies de ciblage thérapeutiques. [2]

Etant donné le grand nombre de voies de signalisation dérégulés dans la tumeur, il existe de nombreuses cibles potentielles à inhiber pour chaque type tumoral. Dès lors la question du choix de la cible est cruciale. Les TC peuvent alors être classées en plusieurs catégories [1] :

- les TC sur des anomalies moléculaires dites causales ou « drivers », directement responsables de la transformation néoplasique
- les TC sur des anomalies moléculaires dites tardives ou « passagers » qui contribuent à la progression tumorale, mais qui ne constituent pas l'étape initiale de la transformation

- les TC sur des cibles moléculaires qui ne jouent pas un rôle direct dans la transformation tumorale.

De nos jours, toutes les disciplines et tous les cancers sont concernés par les TC et il existe un très grand nombre d'essais dans le monde pour corréler la pratique à la théorie.

Parmi les mécanismes cellulaires explorés et imputables à la cancérogenèse, la réponse aux dommages de l'ADN (DNA damage response, DDR) suscite actuellement un grand intérêt. Face aux dommages que subit perpétuellement la molécule d'ADN [7,8], les cellules eucaryotes ont développé un système d'intégration très efficace de différents processus cellulaires pour assurer l'intégrité et la transmission du génome aux générations suivantes. Ce système coordonne à la fois la réplication, le système de réparation pour détecter et réparer les lésions, la progression du cycle cellulaire, la modulation du métabolisme cellulaire et la mort cellulaire programmée. [9]

Le séquençage du génome des cellules cancéreuses a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations au sein de ce système coordonné. Bien que la déficience de ce système participe largement à la carcinogénèse [10], elle offre de nouvelles perspectives thérapeutiques intéressantes déjà exploitées par le passé par certains agents cytotoxiques. Dans l'ère de ciblage thérapeutique de précision, l'exploitation de cette déficience a conduit à la commercialisation en 2015 de l'olaparib (Lynparza®), une TC visant la protéine PARP1 dans le cancer du sein et de l'ovaire mutés BRCA 1 / 2 ainsi qu'à une centaine de candidats-médicaments en cours d'essais cliniques et précliniques. Beaucoup de ces agents ont démontré un effet synergique potentialisateur des agents cytotoxiques. [11]

Dans le cadre de cette stratégie, le laboratoire Vertex Pharmaceuticals™ a lancé en 2012, le développement du VX-970, le premier inhibiteur sélectif de la protéine ATR, un acteur clé dans la réponse aux cassures double brin (CDB) de l'ADN et aux stress réplicatifs et dans l'activation des points de contrôles du cycle cellulaire. La coordination de ces deux processus va permettre la réparation de l'ADN endommagé. De plus, dans le cas où l'ADN est irréparable, des processus d'apoptose ATR-dépendants vont se mettre en place pour éviter la transformation tumorale. [12]

En 2017, le VX-970 fait l'objet de 9 essais cliniques : 6 phases I et 3 phases II encore au stade de recrutement. ([www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vx+970&Search=Search](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vx+970&Search=Search)).

Dans le cadre de son développement, nous décrivons les résultats préliminaires de son essai clinique de phase I, présenté lors d'un poster pendant le congrès annuel de l'ASCO de 2016 (*American Society of Clinical Oncology*).

À l'aide de ces résultats, nous proposerons un modèle pharmacocinétique par une approche de population.

Enfin, nous présenterons la validation de la méthode analytique permettant son dosage dans le plasma humain, selon les recommandations de la F.D.A.



# PARTIE I : LES THÉRAPIES CIBLÉES EN ONCOLOGIE

## A. ÉTATS DES LIEUX

### 1. Les données chiffrées

#### a. L'utilisation des TC en France [5]

Début 2017, 54 TC disposent d'une AMM en France dans le traitement du cancer et 4 disposent d'une ATU de cohorte [13] (Tableau 1).

Parmi ces 58 spécialités :

- 36 sont des molécules chimiques (small molecules)
- 22 sont des bio médicaments (immunoglobulines, protéine de fusion, et bioguidage de cytotoxiques)

Près de la moitié des TC autorisées disposent d'un biomarqueur associé conditionnant leur prescription soit 28 spécialités sur 58. L'accès à ces tests est indispensable pour permettre aux patients un accès à ces traitements.

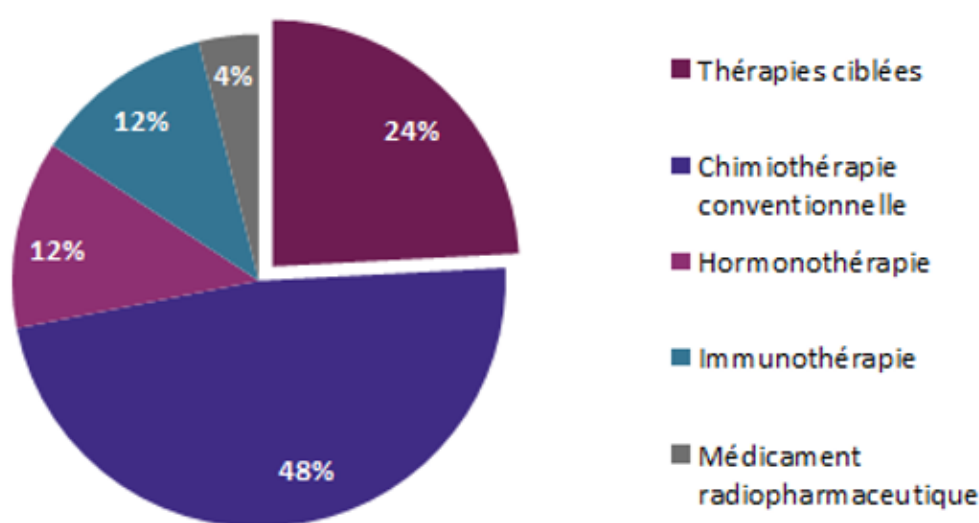
THERAPIES CIBLEES		
INHIBITEUR DE PROTEINE KINASE	IG DIRIGES SUR RECEPTEURS MEMBRANAIRE	
CIBLE INTRACELLULAIRE	CIBLE EXTRACELLULAIRE	
Afatinib BM	Aflibercept	
Axitinib	Atezolizumab BM	
Bosutinib BM	Avelumab BM	ATU
Cabozantinib	Bevacizumab	
Ceritinib BM	Brentuximab vedotin	
Cobimetinib BM	Cetuximab BM	
Crizotinib BM	Daratumumab	
Dabrafenib BM	Denosumab	
Dasatinib BM	Dupilumab	ATU
Erlotinib BM	Gemtuzumab ozo.	ATU
Everolimus	Ibritumomab tiuxetan	
Gefitinib BM	Necitumumab BM	
Ibrutinib	Nivolumab BM	
Idelalisib	Obinutuzumab	
Imatinib BM	Ofatumumab	
Lapatinib BM	Olaratumab	
Lenvatinib	Panitumumab BM	
Lorlatinib	Pembrolizumab BM	
Nilotinib BM	Pertuzumab BM	
Nintedanib	Ramucirumab	
Osimertinib BM	Trastuzumab BM	
Palbociclib	Trastuzumab emtansine BM	
Pazopanib		
Ponatinib BM		
Regorafenib		
Ruxolitinib		
Sonidégib		
Sorafenib		
Sunitinib		
Temsirolimus		
Trametinib BM		
Vandetanib BM		
Vemurafenib BM		
Vismodégib		
AUTRES INHIBITEURS ENZYMATIQUES		
Oliparib BM		
Niraparib	ATU	

**TABLEAU 1.** Liste des 58 TC disponibles autorisées (AMM + ATU) dans le traitement du cancer en 2017

Source : Site officiel de l'Institut National du Cancer (INCa), Site officiel de l'Agence National de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM). Les TC disposant d'un biomarqueur associé à leur prescription sont indiqués par le symbole « BM ».

En France, sur demande du laboratoire et après évaluation de l'ANSM, le système des ATU de cohorte permet aux médecins de proposer aux patients les nouveaux traitements avant qu'ils obtiennent une AMM [14], lorsqu'ils s'adressent à une pathologie grave et répondent à une situation sans « alternative thérapeutique appropriée ». Près de la moitié des TC autorisées par une AMM fin 2016 a été mise à disposition de façon anticipée par le dispositif des ATU de cohorte. [15]

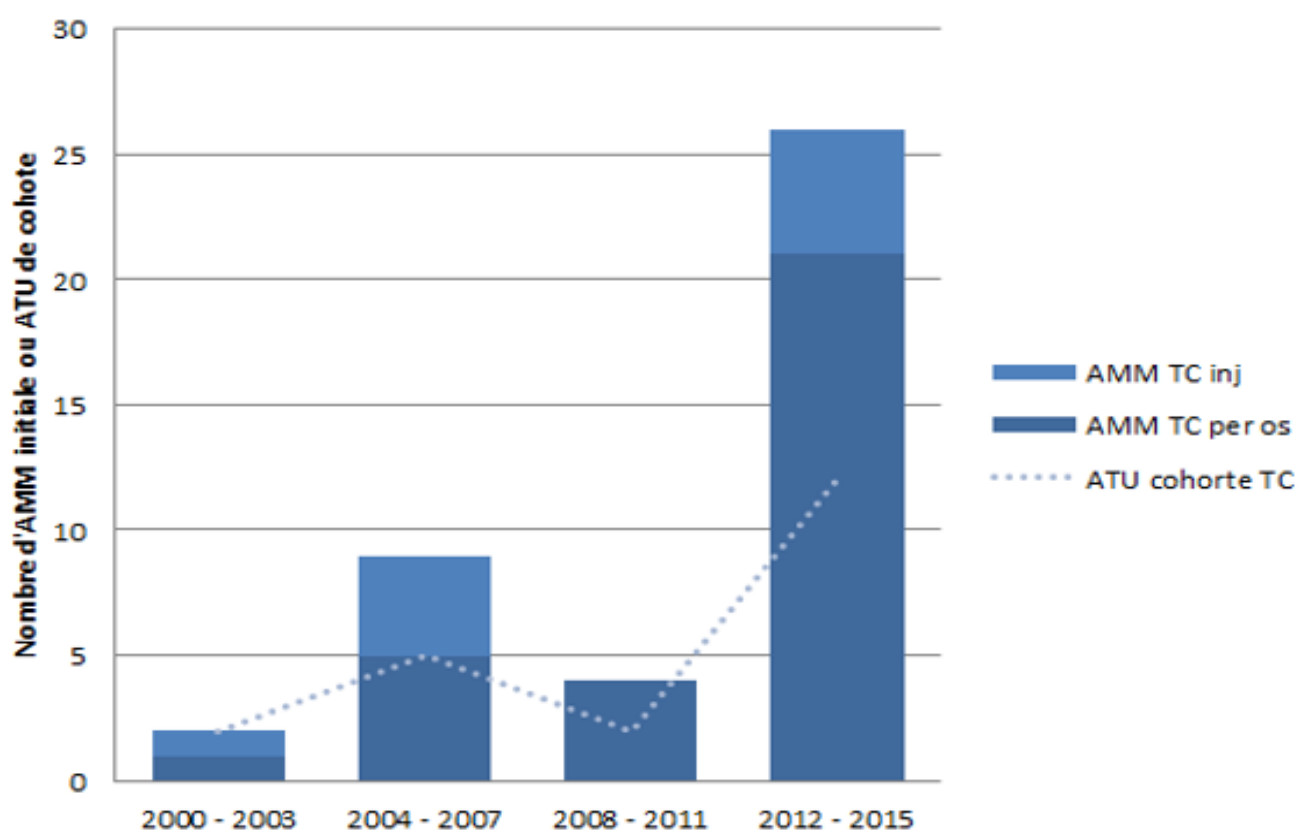
Au sein de l'arsenal thérapeutique anticancéreux, les TC représentent un quart des spécialités disposant d'une AMM dans le traitement spécifique du cancer (Figure 1). La chimiothérapie conventionnelle reste la classe thérapeutique la plus utilisée avec près de 50 % des spécialités disposant d'une AMM.



**FIGURE 1.** Part des TC dans l'arsenal thérapeutique autorisé dans le cancer [5]

Source : site officiel de l'ANSM – Rapport officiel des AMM

Le nombre d'AMM octroyées aux TC a drastiquement augmenté ces dernières années (Figure 2). Alors que 2 TC ont été autorisées sur la période « 2000-2003 », 9 sur la période « 2004-2007 » et 4 sur la période « 2008-2011 », 26 TC ont obtenu une AMM sur la période « 2012-2015 ». 60 % des AMM octroyées à des médicaments anticancéreux sur cette période l'ont été à des TC. Sur la période couvrant 2016-2017, de nouvelles TC sont arrivées sur le marché, principalement dans le cadre de l'immunothérapie spécifique.



**FIGURE 2.** Nombre d'AMM initiales octroyées pour des TC injectables (AMM TC inj) ou des TC par voie orale (AMM TC per os) entre 2000 et 2015, rapporté par tranches de 4 années. [5]

Source : site officiel de l'ANSM – Rapport officiel des AMM

Cette accélération est le probable résultant de 3 facteurs :

- Un accroissement à l'échelle mondiale de la pathologie cancéreuse. Le cancer constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde pour un coût de 1160 milliards de dollars en 2015 selon les chiffres de l'OMS [16] ce qui traduit une demande en thérapie efficace très importante.
- Les révolutions successives dans le champ du génie génétique et des techniques d'analyses moléculaires à haut débit (génomique, séquençage, protéomique) qui a permis la compréhension intime des mécanismes oncogéniques. Ces hautes technologies permettent l'exploitation simultanée d'un grand nombre de paramètres
- L'utilisation à grande échelle de ces outils toujours plus performants.

Les TC sont majoritairement destinées à une prise par voie orale [5] : 36 thérapies sur 58 (63 %) sont prises per os contre 21 en injectable (27%). Parmi l'ensemble des médicaments anticancéreux par voie orale disponibles en France, la classe des TC est, en nombre de DCI, prépondérante (44 %) devant la chimiothérapie conventionnelle (36 %) ou l'hormonothérapie (17 %).

## b. Les indications des TC

Fin 2015, 98 indications thérapeutiques sont enregistrées dans le traitement du cancer pour 43 TC autorisées. (Tableau 2). Le nombre d'indications enregistrées pour chaque TC est variable allant d'une seule indication à 9 indications (bêvacizumab, imatinib, trastuzumab).

NOMBRE D'INDICATIONS AUTORISÉES FIN 2015		98
Médiane		1
Moyenne		2,25
Min		1
Max		9
Nombre de TC avec une indication thérapeutique unique		22 sur 43 thérapies

**TABLERAU 2** : Nombre d'indications thérapeutiques autorisées (AMM ou ATU de cohorte) pour les TC [5] Source : site officiel de l'ANSM – Rapport officiel des AMM

Bien que la majorité des TC soient autorisées dans un seul type de cancer (avec une ou plusieurs indications), une molécule peut être indiquée dans des localisations tumorales très différentes :

- 10 molécules sont autorisées dans deux localisations distinctes
- 5 molécules sont autorisées dans trois localisations distinctes
- 2 molécules sont autorisées dans au moins quatre localisations distinctes

La proportion du nombre de localisations autorisées par spécialité tend à augmenter ces dernières années avec l'exploration des mécanismes oncogéniques communs au développement tumoral. C'est le cas des agents de l'immunothérapie spécifique, qui a permis d'identifier le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1 mais également les voies de développement des cellules souches parmi lesquelles on compte la voie Hedgehog, la voie Notch, et la voie de transition épithélio-mesenchymateuse (TEM).

Ceci est le reflet de deux phénomènes :

- Les TC peuvent inhiber des mécanismes oncogéniques qui sont communs à différentes pathologies cancéreuses : c'est par exemple le cas de l'angiogenèse. Le bévacizumab, un anticorps ciblant spécifiquement le VEGF est indiqué au moins dans six tumeurs solides (utérus, ovaire, rein, poumon, sein et colorectal)
- Une molécule peut agir sur différents mécanismes oncogéniques : c'est par exemple le cas de l'imatinib qui est utilisé comme inhibiteur de BCR-ABL dans le traitement de la LMC et inhibiteur de KIT et PDGFR dans le traitement du GIST.

Actuellement, 24 mécanismes oncogéniques sont bloqués par une ou plusieurs TC (Tableau 3). Ces mécanismes oncogéniques ont une importance variable sur la tumorigenèse. La notion « d'addiction oncogénique » d'une tumeur est utilisée pour qualifier le fait que l'activité continue d'un seul oncogène puisse parfois être responsable de la survie anormale d'une cellule : on parle aussi d'anomalies « conductrices » (*driver*) [1,2,6]. À l'inverse, lorsqu'une aberration génétique n'est présente qu'en raison de l'instabilité génétique des cellules tumorales mais ne contribue pas aux mécanismes de l'oncogenèse, on parle d'anomalies « passagères » (*passenger*).

	THERAPIES CIBLEES					
VOIES ONCOGENIQUES	INHIBITEURS INTRACELLULAIRE			INHIBITEURS EXTRACELLULAIRE		
RAS-RAF-MEK-ERK	Sorafenib	Vemurafenib	Dabrafenib			
	Regorafenib	Trametinib	Cobimetinib			
PI3K-AKT-mTOR	Temsirolimus	Everolimus	Idelalisib			
BCR-ABL	Imatinib	Bosutinib	Nilotinib			
	Ponatinib	Dasatinib				
EGF-R (1 et 2)	1		2	1	2	
	Erlotinib	Gefinitib	Lapatinib	Cetuximab	Trastuzumab	Pertuzumab
	Osimertinib	Vandetanib	Afatinib	Panitumumab	Trastuzumab emtansine	
	Afatinib			Dépatuxizumab mafodotine		
VEGF-R	Axitinib	Ponatinib	Regorafenib	Aflibercept	Bevacizumab	Ramucirumab
	Sorafenib	Sunitinib	Pazopanib			
	Lenvatinib	Nintedanib	Vantedanib			
	Cabozantinib					
PDGF-R	Imatinib	Bosutinib	Dasatinib			
	Ponatinib	Sorafenib	Sunitinib			
	Regorafenib	Pazopanib	Lenvatinib			
	Nintedanib	Nilotinib				
FGF-R	Nintedanib					
c-MET	Cabozantinib					
KIT	Imatinib	Sunitinib	Regorafenib			
	Bosutinib	Dasatinib	Nilotinib			
	Ponatinib	Sorafenib	Pazopanib			
	Lenvatinib	Cabozantinib				
ALK	Ceritinib	Crizotinib	Brigatinib			
	Lorlatinib					
CDK (CDK4/6)	Palbociclib					
ROS-1	Crizotinib	Lorlatinib				
GDNF/RET	ponatinib	Sunitinib	Regorafenib			
	lenvatinib	Vantedanib	Cabozantinib			
PD-1				Pembrolizumab	Nivolumab	
AntiPDL1				Atezolizumab	Avelumab	
Hegdehog	Sonidégib	Vismodégib				
Transition Epithelio-Mesanchymateuse (AXL)	Cabozantinib					
Inhibition des Osteoclates (RANK)				Denosumab		
Croissance Myeloide (JAK)	Ruxolitinib					
Activation Ly B (BTK, CD20))	Ibrutinib			Obinutuzumab	Ofatumumab	
				Ibritumomab tiuxetan		
DDR (PARPP)	Oliparib	Niraparib				
SIGLEC (CD33)				Gemtuzumab ozogamicine		
TNF-R (CD30)				Brentuximab vedotin		
Glycolipides					Dinutuximab	

**TABLEAU 3** : Classification des TC en fonction de la voie oncogénique mise en jeu.

Source : site officiel de l'ANSM – Rapport officiel des AMM



Une TC peut cibler un ou plusieurs mécanismes oncogéniques. C'est le cas des inhibiteurs des protéines tyrosine-kinase (ITK) « multi-kinases » qui inhibent des kinases impliquées dans différentes voies de signalisations. De manière réciproque, un mécanisme oncogénique peut être ciblés par une ou plusieurs molécules. Ces molécules peuvent avoir des utilisations thérapeutiques semblables (médicaments « *me too* ») avec cependant des profils de toxicités qui ne sont pas superposables. Les anticorps sont, quant à eux, toujours spécifiques d'une seule cible.

La polyclonalité dynamique au sein de la tumeur a conduit au développement de molécules « nouvelle génération », dans but de surpasser les résistances acquises par certains types de clones. En effet, une TC efficace de 1ère génération va éliminer les sous-clones sensibles, mais en même temps sélectionner les clones les plus agressifs et les plus résistants. Ainsi les molécules 2<sup>èmes</sup> et 3<sup>ème</sup> génération vont cibler ces clones résistants, jusqu'à la prochaine sélection clonale [2]. Ceci peut être illustré par l'erlotinib, molécule « *first in class* » de la classe des inhibiteurs de l'EGFR, et l'osimertinib une molécule de 3<sup>ème</sup> génération capable de dépasser la résistance acquise par certains clones à l'erlotinib (mutation T790M). Par ailleurs, le développement de molécules nouvelle génération peut se produire dans le cadre d'une amélioration de l'efficacité ou du profil des toxicités.

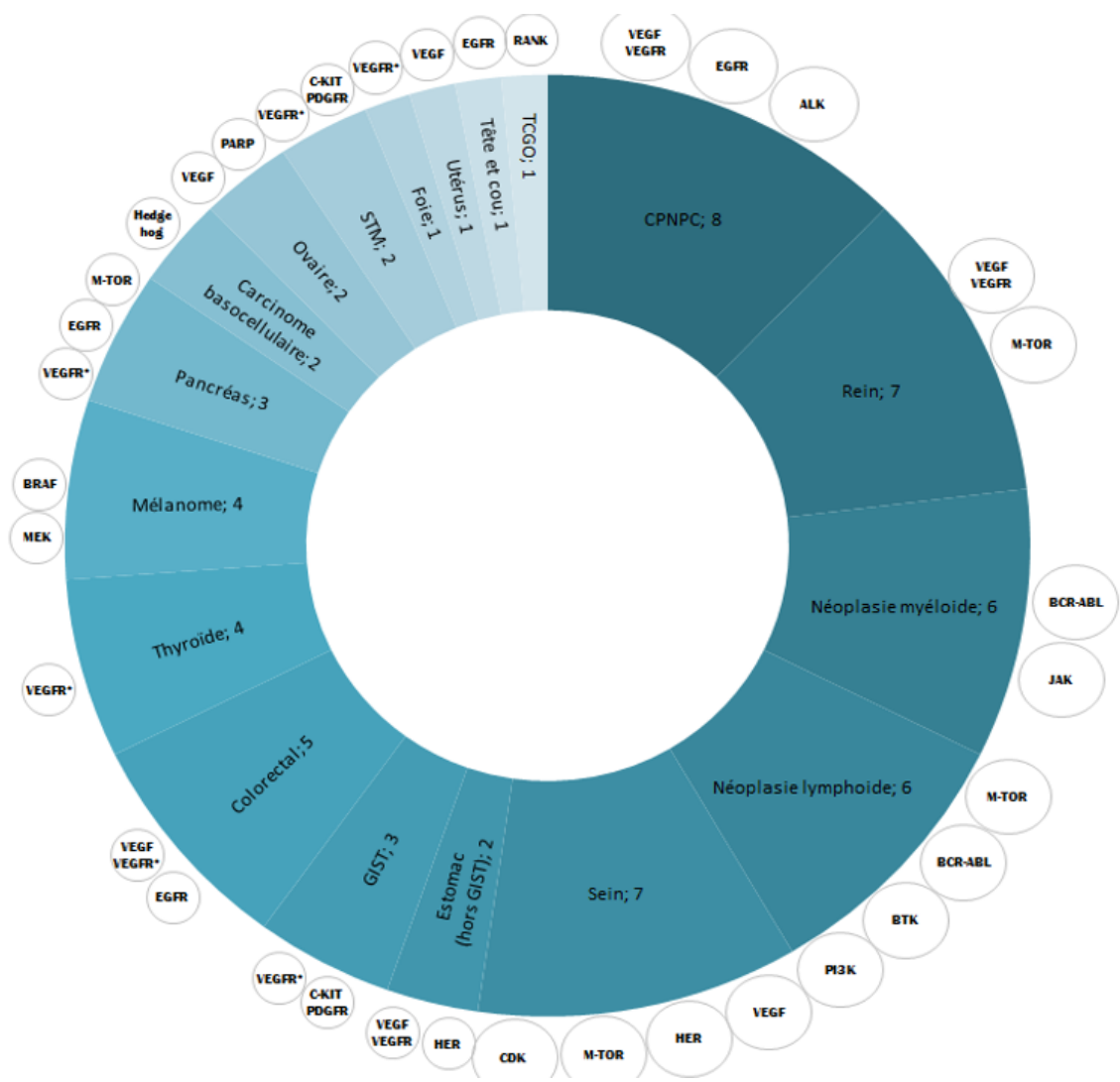
Enfin, il faut noter que certains mécanismes oncogéniques ont fait l'objet d'un développement conséquent depuis plusieurs années (les inhibiteurs de BCR-ABL par exemple), alors que d'autres mécanismes ne sont ciblés que depuis récemment et par un nombre encore limité de molécules (seul l'ibrutinib est autorisé dans le ciblage de la tyrosine-kinase de Bruton).

Une TC peut être indiquée :

- dans plusieurs localisations tumorales ou types d'hémopathies
- à plusieurs étapes de la stratégie thérapeutique (ligne de traitement, stade)
- selon plusieurs modalités (monothérapie ou association).

16 localisations en oncologie solide sont concernées ainsi que les hémopathies malignes myéloïdes et les hémopathies malignes lymphoïdes (Figure 3).

Le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC), le cancer du rein, les hémopathies malignes (myéloïdes et lymphoïdes) et le cancer du sein sont les localisations disposant actuellement du plus grand nombre de TC autorisées pour leur traitement.



**FIGURE 3 :** Nombre de TC différentes ayant au moins une indication dans chaque localisation tumorale. Source EMA/ANSM. Traitement INCa 2015

Les cercles à l’extérieur du graphique indiquent les mécanismes oncogéniques visés par les TC dans la localisation concernée. Le symbole \* indique que la TC est un inhibiteur multikinase.  
 Abréviations : CPNPC : cancer du poumon non à petites cellules ; GIST : tumeur stromale gastro-intestinale ; STM : sarcome des tissus mous ; TCGO : tumeur à cellules géantes de l’os.

Des localisations tumorales ont bénéficié de la mise à disposition d'une ou plusieurs TC alors même que leur arsenal thérapeutique médicamenteux était très réduit voire inexistant [5]:

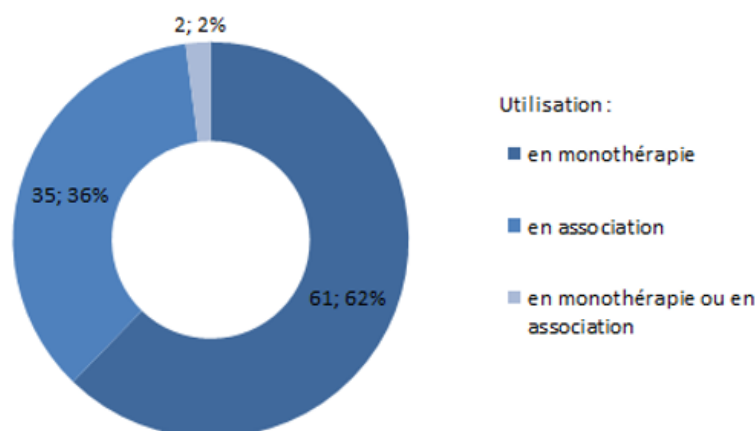
- la prise en charge des GIST (*Gastro Intestinal Stroma Tumor*) non résécables ou métastatiques s'appuie désormais sur trois TC que sont l'imatinib, le sunitinib et le régorafénib autorisés respectivement en 1ère, 2ème et 3ème ligne.
- l'arsenal thérapeutique des cancers de la thyroïde a été complété par quatre TC : le cabozantinib et vandetanib indiqués dans le traitement des carcinomes médullaires localement avancé ou métastatique, le sorafenib et lenvatinib dans les carcinomes différenciés réfractaires à l'iode radioactif.
- le dénosumab est le seul médicament autorisé pour le traitement de tumeurs osseuses à cellules géantes non résécables, pathologie rare et qui concerne principalement des enfants .

Malgré cet éventail de localisations tumorales visées par les TC, quelques localisations tumorales ne disposent fin 2015 d'aucune TC dans leur arsenal thérapeutique:

- les tumeurs du système nerveux central et le cancer du poumon à petites cellules ne sont traités par aucune TC.
- le cancer de la prostate n'est pas non plus visé par les TC. Toutefois, cette localisation a bénéficié ces dernières années d'un enrichissement notable de sa stratégie médicamenteuse par la mise sur le marché de deux hormonothérapies de nouvelle génération (enzalutamide, acétate d'abiratéron) d'un nouveau cytotoxique (cabazitaxel) et d'un radionucléide [18].

L'offre des TC reste également très limitée dans certaines localisations telles que la tête et le cou, l'utérus et le foie.

La majorité des TC est utilisée en monothérapie, en particulier les inhibiteurs de protéine kinase (Figure 4.)

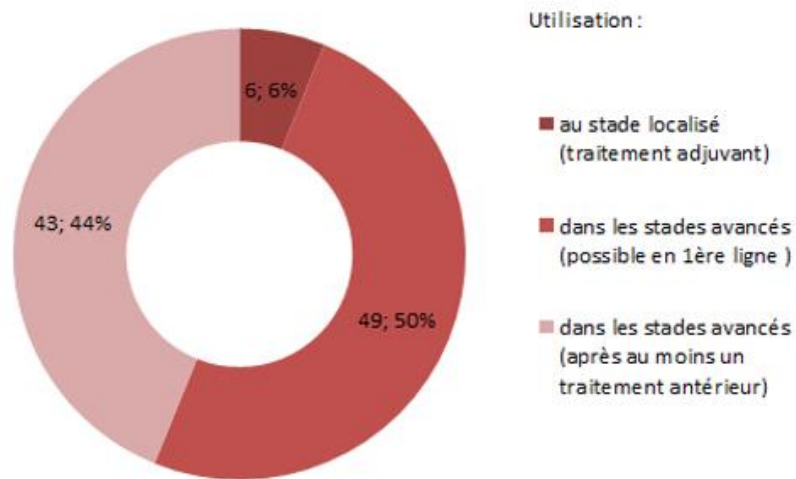


**FIGURE 4 :** Modalités d'utilisation des TC, en monothérapie ou en association, selon leurs indications thérapeutiques. Source EMA/ANSM. Traitement INCa 2015

Les TC peuvent également être combinées à un traitement déjà disponible lorsque la combinaison a démontré une efficacité supérieure au traitement de référence utilisé seul. Il peut s'agir de [5] :

- L'association concomitante d'une TC à une chimiothérapie cytotoxique (par exemple bévacizumab et doublet de platine dans le cancer de l'ovaire) ou immédiatement après une chimiothérapie cytotoxique (par exemple olaparib après un doublet de platine dans le cancer de l'ovaire)
- L'association de TC entre elles (par exemple trastuzumab et lapatinib)
- L'association d'une TC à une hormonothérapie (par exemple évérolimus et exémestane)
- L'association d'une TC à une immunothérapie spécifique (par exemple idélalisib et rituximab).

Les indications des TC intéressent quasi exclusivement des patients atteints d'une hémopathie ou d'une tumeur solide localement avancée ou métastatique. Seules 6 indications thérapeutiques, portées par trois TC, sont autorisées en traitement adjuvant ou néoadjuvant (trastuzumab et pertuzumab dans le cancer du sein, imatinib dans les GIST). Plus de la moitié des indications autorisent une utilisation chez le patient naïf de traitement (indication restreinte à la 1ère ligne ou indication ne spécifiant pas la ligne de traitement).



**FIGURE 5 :** Moment d'utilisation des thérapies TC, en fonction du stade de la maladie, conformément à leurs indications thérapeutiques. Source EMA/ANSM. Traitement INCa 2015

Par ailleurs, la connaissance des mécanismes impliqués dans les échecs thérapeutiques s'améliore et des stratégies adaptées sont maintenant autorisées pour y répondre. L'émergence de résistances après un traitement ciblé doit conduire à analyser les options thérapeutiques qui permettent le contrôle de la croissance de clones agressifs. Plusieurs types de stratégies peuvent être distingués :

- en cas d'échec thérapeutique, poursuite de la même TC en association à une chimiothérapie cytotoxique (par exemple, bévacizumab, en association à une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine dans le cancer colorectal) ou recours à une TC agissant sur la même voie mais appartenant à une autre classe (par exemple aflibercept en 2ème ligne dans le cancer colorectal après échec d'un traitement par bévacizumab)
- en cas de résistance, association de plusieurs TC agissant sur la même voie de signalisation mais en des points différents (par exemple association lapatinib et trastuzumab dans le cancer du sein après échec d'un traitement par trastuzumab)

- afin d'éviter l'apparition précoce de clones résistants, association d'emblée de plusieurs TC agissant sur des voies de signalisation complémentaires (par exemple anti-BRAF et antiMEK dans le mélanome) permettant de cibler plusieurs clones à la fois.
- en cas de résistance, recours à une TC de nouvelle génération efficace contre les clones résistants ayant émergé dans la tumeur (par exemple ponatinib chez les patients ayant une LMC présentant la mutation T351I).

## 2. La classification

### a. Historique

L'arrivée des TC sur le marché, a bouleversé la classification des anticancéreux et il n'existe actuellement pas de consensus scientifique mondiale, sur leur répartition et plus précisément sur la définition et le périmètre des TC. [21]

Pendant plusieurs décennies, la répartition des anticancéreux s'effectuait en 3 groupes : la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie (Tableau 4). Mais avec le temps, cette classification a perdu son utilité. [21]

**TABLE I** Classical classification of anticancer drugs

Chemotherapy	Alkylators
	Antibiotics
	Antimetabolites
	Topoisomerases inhibitors
	Mitosis inhibitors
	Other
Hormonal therapy	Steroids
	Anti-estrogens
	Anti-androgens
	LH-RH analogs
	Anti-aromatase agents
Immunotherapy	Interferon
	Interleukin 2
	Vaccines

**TABLEAU 4** : Classification historique des anticancéreux

Historiquement, la chimiothérapie se regroupait soit en fonction de la nature chimique soit par leur mécanismes d'actions : les agents alkylants, les antibiotiques, les antimétabolites, les inhibiteurs de topo isomérase I et II (Topo), les inhibiteurs de la mitose, les sels de platine et les autres. Cependant, avec l'arrivée des TC et la découverte de nouvelles voies oncogéniques, le groupe des « autres », s'est largement étendu et a rendu cette répartition obsolète. Intuitivement, il fallait introduire la notion de cible. Mais il existe de nombreux autres critères permettant de classer les anticancéreux comme par exemple le mécanisme d'action, la phase du cycle cellulaire, la nature chimique de l'agent, la nature chimique de la cible etc.

Selon l'étude [21], une classification des drogues a deux objectifs principaux :

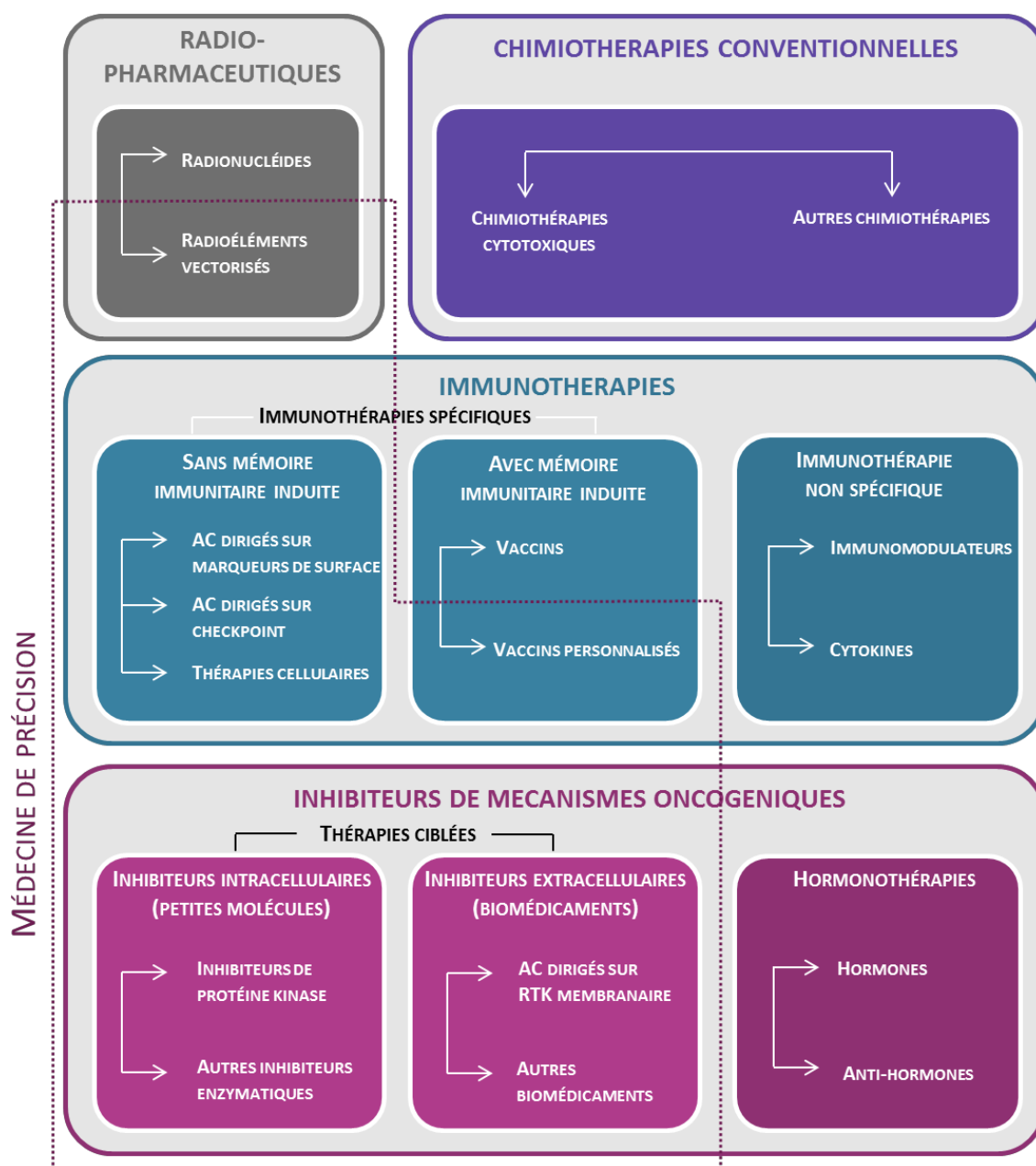
- La réalisation d'une vue d'ensemble des spécialités disponibles
- Une conception théorique facile de combinaisons thérapeutiques

De nos jours, les schémas polychimiothérapeutiques sont de plus en plus fréquents dans l'objectif d'obtenir un effet synergique, et comprennent habituellement des médicaments appartenant à différentes classes pour augmenter l'efficacité et diminuer la toxicité. D'autre part, une vision globale permet de rappeler les médicaments et leurs mécanismes d'actions à des fins pédagogiques.

## b. La classification de l'Institut National du Cancer

L'Institut National du Cancer (INCa) propose de classer les anticancéreux en quatre grandes catégories [5] en fonction soit du type de la cible, soit du type d'agent [5] :

- Les chimiothérapies conventionnelles,
- Les radiopharmaceutiques,
- Les immunothérapies,
- Les inhibiteurs de mécanismes oncogéniques qui intègrent les TC (Tableau 5.)



**TABEAU 5 : Classification des anticancéreux établie par l'INCa [5]**

Source : Les TC Dans Le Traitement Du Cancer En 2015, État des lieux et enjeux, Institute National du Cancer, Jonathan FINZI et al. Abréviations : AC : anticorps ; RTK : récepteur tyrosine kinase

Dans cette classification, les TC se définissent comme inhibiteur stricto-sensu de voies oncogéniques, ce qui n'est pas le cas dans de nombreux ouvrages et publications. Actuellement, certaines classes partagent des caractéristiques communes avec les TC, notamment l'hormonothérapie et l'immunothérapie spécifique d'un type d'anticorps :



- L'hormonothérapie bloque l'action pro-oncogénique des stéroïdes dans le cancer du sein, des ovaires et de la prostate. À ce titre, elle peut être rapprochées des TC, dans la classe des inhibiteurs de mécanismes oncogéniques
- L'immunothérapie spécifique se fixant à des antigènes de surface (par exemple les récepteurs clusters de différenciation) sont considérées la plupart du temps comme des TC.

Les TC sont ici divisées, en 2 sous-ensembles en fonction de la localisation de la cible selon qu'elle soit intra ou extracellulaire. Bien que cette répartition soit élégante, elle est limitée dans le sens où elle ne prend pas compte les voies oncogéniques mise en jeux. De ce fait elle a peu d'intérêt sur le plan clinique.

En revanche, cette répartition est remarquable dans le fait qu'elle délimite un groupe d'anticancéreux qui s'intègre dans "la médecine de précision". Ce terme fait référence à une médecine qui repose sur des traitements développés sur les bases d'une meilleure connaissance des mécanismes biologiques conduisant à l'apparition et au développement des tumeurs. Dans le cas de ces traitements, la prescription est guidée dans la mesure du possible, par les caractéristiques moléculaires de la tumeur de chaque patient, le plus souvent à l'aide de biomarqueurs. Ils permettent de tester les patients afin d'identifier ceux qui sont porteurs ou non d'une altération moléculaire et guidera la décision de traitement (médecine stratifiée).

Dans cette classification, nous pouvons remarquer que la médecine de précision inclut plus de la moitié de l'arsenal thérapeutique actuel. Ceci témoigne des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes oncogéniques et de l'utilisation à grande échelle des outils de biologie moléculaire toujours plus performants. À l'avenir et avec l'évolution des connaissances de la biologie des cancers d'une part et des TC disponibles d'autre part, la caractérisation moléculaire de la tumeur pourrait ne pas se limiter à l'identification d'une altération moléculaire unique mais pourrait intégrer un ensemble complexe de caractéristiques génomiques qui ferait de la tumeur de chaque patient une pathologie unique. Chaque patient se verrait alors proposer un traitement qui lui serait spécifiquement adapté.

### c. Classification établie par Enrique et al.

Une classification idéale décrirait l'ensemble des anticancéreux avec le plus de critères d'informations, en gardant la possibilité d'intégrer les futures spécialités susceptibles d'arriver sur le marché avec une grande clarté.

C'est ce que Enrique Espinosa et al. ont essayé de réaliser dans leur publication [21]. (Tableau 6.) Ils sont partis du principe qu'il était inutile de détailler les mécanismes d'actions. D'une part parce qu'une partie des anticancéreux ont un mécanisme encore incertain. D'autre part, parce que certaines TC ont une action pharmacologique complexe, en interagissant avec plusieurs cibles à la fois. Cette classification comprend 3 critères : la localisation de la cible, la nature de la cible et le type de dommage induit par l'agent. Elle permet de situer dans au moins une catégorie, toute les spécialités anticancéreuses en conservant la possibilité d'inclure les drogues en cours de développement.

Target		
Tumour	DNA	<i>Non-specific</i> DNA break: chemotherapy DNA-related proteins: chemotherapy <i>Specific</i> Hormonal therapy, retinoids Interferon $\alpha$ Gene therapy
	RNA	Antisense oligonucleotides
	Proteins	<i>Membrane receptors</i> Extracellular domain: MoAb Intracellular domain: small molecules <i>Cytoplasm</i> Intracellular pathways: small molecules Tubulin: chemotherapy
Endothelium (*)	DNA	Combretastatin
	Proteins	Monoclonal antibodies Small molecules
Extracellular matrix	MMPs	MMPs inhibitors
	Other elements	Monoclonal antibodies and small molecules
Immune system	Lymphocytes and macrophages	Interferons Interleukin2 Vaccines
Host cells	Bone cells	Bisphosphonates, osteoprotegerin

\* In this group, antisense therapy might also be developed in the future.  
MoAb, monoclonal antibodies and MMPs, metalloproteinases.

**TABLEAU 6** : Classification des anticancéreux établie par Espinosa et al. [21]

Cependant, l'absence du nom de la cible ou du mécanisme d'action, permet difficilement de remplir l'objectif de la conception théorique de combinaisons thérapeutiques. À défaut de pouvoir citer avec certitude la cible ou le mécanisme d'action de nombreux anticancéreux, nous pouvons suggérer d'introduire un critère supplémentaire décrivant la voie de signalisation dans laquelle appartient la cible. Nous avons tenté de réaliser cette classification en copiant celle d'Enrique Espinosa et al. puis en y ajoutant une information sur la voie de signalisation. Ainsi l'ensemble des anticancéreux présent et à venir pourront s'intégrer dans cette classification. Cependant, il sera indispensable de construire des annexes qui énuméreront l'ensemble des spécialités disponibles pour chaque voie.

#### d. Proposition d'une classification

**TABLEAU 7** : Proposition d'une classification

Ou	Tumeur				Environnement tumorale					Sys Imm	
Quoi	ADN			ARN	Proteines Cytoplasmique	Endothelium			MEC	C hôte	
	Aspecifique gene	Specifique genes				ADN	ARN	Proteines			
Comment	ADN breakers	ADN prot-related	Oeustrogenes	Oligonucleotides antisens de la telomerase	Proteasomes	Microtubules	Oligonucleotides antisens	VEGFR PDGFR	MMP	Inhibition des Osteoclates (RANK) Transition Epithelio-Mesanchymateuse (AXL)	CTLA4 PD1 PDL-1 Interferons InterLeukines Vaccins
	/	Topoisomerase	Androgenes		RAS-RAF-MEK-ERK						
		Folates	Corticoides		PI3K-AKT-mTOR						
		Bases Puriques	Retinoid		BCR-ABL						
	Bases Pyrimidiques	Cytokines		KIT							
	ADN methyl-transferase	Therapie genique		CDK4/6 INHIBITORS							
	Reparation NER			BRCA1 AND BRCA2							
	Histone desacetylase			c-MET							
	Microtubules du fuseau			ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE							
	Telomerase			ROS-1							
				GDNF/RET							
				Hegdehog							
				Recepteurs							
				DDR (PARPP)							
				EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR							
				ANDROGEN RECEPTOR INHIBITION							
				FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR							
				INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR							
				MYELOID COLONY GROWTH (JAK)							
				HEPATOCYTE GROWTH FACTOR RECEPTOR (MET)							
				SIGLEC (CD33)							
				Activation Ly B (BTK)							

### 3. Les succès thérapeutiques

Les TC répondent initialement à un besoin que la chimiothérapie conventionnelle a du mal à satisfaire. Celle de traitement d'une meilleure efficacité, d'une plus grande sélectivité vis-à-vis de la cible tumorale et d'une meilleure tolérance dans le but d'améliorer et d'accroître la survie du patient. Dans le cadre de cette demande, l'émergence des TC a conduit à de véritables prouesses dans la prise en charge du cancer permettant une régression significative de la tumeur, un allongement du taux de survie considérable et dans certains cas une rémission globale, dans des situations autrefois considérées comme des impasses thérapeutiques. De nombreux ouvrages et publications font états de 5 révolutions thérapeutiques majeures depuis l'avènement des TC en oncologie [21-25] :

- Le trastuzumab dans le cancer du sein HER2+
- L'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique
- Les anti-angiogéniques dans le cancer du rein métastatique
- Les anti-EGFR et ALK dans le cancer bronchique non à petites cellules
- Les anti-BRAF et l'immunothérapie spécifique dans le traitement du mélanome métastatique

#### a. Le trastuzumab dans le traitement du cancer du sein HER2+

Le trastuzumab constitue le premier traitement par anticorps monoclonal humanisé ciblant une oncoprotéine. Il agit à la fois en inhibant la transduction du signal dépendante du récepteur en favorisant l'internalisation et la dégradation d'HER2 mais probablement aussi par le biais d'une réponse immune de type ADCC [26]. La pharmacologie du trastuzumab repose sur un blocage en aval des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK/MERK.

Il représente une révolution dans la prise en charge du cancer du sein surexprimant le récepteur HER2 [23] détecté dans 15 à 25% des cancers du sein invasif et 40% des cancers du sein inflammatoire. L'effet est notamment spectaculaire en situation adjuvante [28] où il permet dans cinq essais randomisés avec un recul médian de 3 à 4 ans d'éviter 1 rechute métastatique sur 2 et 1 décès sur 3. Son indication est strictement réservée aux cancers du

sein présentant une amplification du récepteur HER2 démontrée par la méthode FISH ou par immunohistochimie. [23]

Initialement la surexpression du récepteur HER2 dans le cancer du sein était associé à un pronostic péjoratif. [26] Le statut HER2+ dans la classification moléculaire des cancers est caractérisé par un grade élevé, un profil évolutif métastatique plus important particulièrement au niveau cérébral et viscéral, une infiltration ganglionnaire et un index mitotique élevé [29]. La valeur du pronostique associé à la surexpression d'HER2 a fait l'objet de nombreux travaux [29-31], étant notamment prédictif d'une résistance au tamoxifène et de façon générale aux hormonothérapies pour la moitié des tumeurs qui expriment des récepteurs hormonaux (ER+, PR+) [32-34]. De nombreuses données expérimentales ont confirmé l'existence de *cross-talks* (ou dialogue croisé) entre les voies de transductions du signal de prolifération dépendantes des récepteurs d'œstrogène et d'HER2 pouvant expliquer cette résistance au Tamoxifène. [35].

Le développement du trastuzumab dans les années 1995, en monothérapie, a démontré une activité très modeste mais c'est en association avec la chimiothérapie en 1<sup>ère</sup> ligne qui a établi son importance. [26]

À la suite de plusieurs essais cliniques, l'agent est devenu définitivement la colonne vertébrale du traitement de première ligne en association avec un taxane (docétaxel et paclitaxel suivant un régime posologique différent), en phase métastatique de toutes les patientes qui présentent une tumeur surexprimant HER2. [36].

La deuxième problématique, a été de confirmer si son administration était légitime au-delà de la première ligne. La capécitabine était le traitement de référence après l'utilisation des taxanes et des antracyclines (ici contre-indiqué en raison de la potentialisation de l'effet cardio-toxique). En 2009, l'étude de Von Minckwitz [37] a permis de confirmer que l'association capécitabine-trastuzumab a montré un bénéfice en termes de taux de réponse et de survie sans progression (8,2 vs. 5,6 mois) en comparaison à la capécitabine seule, établissant, dans tous les référentiels de bon usage, qu'en deuxième ligne la poursuite du trastuzumab avec la chimiothérapie était légitime.

Depuis, le cancer du sein HER2+ a fait l'objet de nombreux progrès thérapeutiques, parmi lesquels nous pouvons citer [38] :

- Le lapatinib, de la classe des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine-kinase, a permis d'améliorer les taux de réponses et les survies sans progressions en deuxième ligne métastatique et constitue une excellente alternative au Trastuzumab, permettant de contourner les mécanismes de résistances à l'anticorps anti-HER2. Il est également très utile en cas de métastases cérébrales du fait de sa grande biodisponibilité.
- Le pertuzumab, un autre anticorps monoclonal du récepteurs HER2 dont le site de fixation diffère de celui du Trastuzumab et permet également de contourner une résistance au Trastuzumab.
- Le T-DM1, développe une stratégie originale, consistant au bioguidage de l'emtansine, une molécule cytotoxique, par le trastuzumab, permettant de l'amener directement dans la cellule tumorale et réduisant ainsi de manière significative les effets indésirables.

La détermination du statut tumorale HER2 est un élément incontournable dans la prise en charge des cancers du sein. L'efficacité du trastuzumab et du lapatinib est clairement corrélée au facteur prédictif de réponse que constitue la présence d'une amplification du gène HER2 que l'on détermine soit par immunohistochimie (détection de la surexpression de la protéine HER2), soit par amplification du gène codant (technique FISH ou CISH). [23]

#### b. L'imatinib dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique

La LMC est un syndrome myéloprolifératif dont l'histoire naturelle a été révolutionnée par l'Imatinib de sorte qu'elle est considérée aujourd'hui comme une maladie « modèle » qui pourrait aider au développement de molécules spécifiques dans d'autres tumeurs [26].

Avant les années 2000, la LMC évoluait classiquement en 3 phases :

- Une phase chronique ou stable de 3 à 5 ans
- Une phase accélérée de 1 à 2 ans
- Une phase de crise blastique à partir de laquelle la médiane de survie n'est que de 3 mois

Depuis l'apparition de l'imatinib, la LMC est une maladie chronique avec peu d'évènements de progressions vers la phase blastique et des patients qui ont des survies très prolongées [40]. Cette spécialité s'intègre dans une stratégie de ciblage des anomalies moléculaire causales dite « drivers » jouant le rôle d'addiction oncogénique. Il s'agit de la protéine tronquée BCR-ABL, acteur central de la transformation maligne, issue de la fusion chimérique au niveau de la partie terminale du gène *abl* (chromosome 9) et le début du gène *bcr* (chromosome 22) donnant naissance au chromosome de Philadelphie (Ph). On parle de LMC-Ph+ (95% des LMC). Ce dernier constitue le biomarqueur de diagnostic de la LMC que l'on peut identifier grâce à 3 méthodes [23] :

- Le caryotype
- L'hybridation par sonde fluorescence
- La réaction en chaînes par polymérase (PCR)

L'imatinib a été conçu pour inhiber spécifiquement l'activité kinase de BCR-ABL au niveau du site de fixation de l'ATP riche en glycine appelé P-loop. Il s'est révélé plus tard être inhibiteur d'autres kinases telle que c-Kit, le récepteur au PDGF, ou le récepteur au M-CSF [41]. Dans le cadre de la prise en charge de la LMC, l'Imatinib s'avère être très supérieur à l'association interféron  $\alpha$  + cytarabine selon l'étude de phase III IRIS (*International randomized study of interferon and ST1571*) [3]. Cette supériorité s'articule autour de 3 critères :

- La réponse complète hématologique (RCH) se définit par la disparition des signes cliniques et la normalisation de l'hémogramme. Elle atteint 97% en quelques semaines pour les bras imatinib.
- La réponse cytogénétique qui est complète lorsque l'on ne détecte plus aucunes métaphases portant la translocation Ph+. Elle atteint 83% pour les patients des bras imatinib vs. 34,7% pour les bras IFN $\alpha$ . Ce critère est le « gold standard » traditionnel pour prédire la survie sans progression et la survie globale chez le patient traité par imatinib



- La réponse moléculaire est déterminée par l'amplitude de diminution du ratio des transcrits « BCR-ABL/ABL » exprimé en pourcentage et déterminé grâce aux techniques standardisées FISH et PCR. La majorité des patients répondant à l'imatinib dans l'essai IRIS ont obtenu une réponse moléculaire majeure, une diminution de 3 log par rapport à la ligne de base, définie par convention comme valeur de référence dans l'étude l'IRIS. Il a été montré que la réponse moléculaire est un facteur pronostique plus puissant que la réponse cytogénétique.

Un suivi rigoureux est essentiel afin d'identifier précocement les malades qui ont une tolérance insuffisante, une réponse nulle [22] ou sous-optimale, en particulier si celui-ci est candidat à une allogreffe médullaire. Chez ce type de malade, on peut soit majorer la dose d'imatinib, soit opter pour une molécule de deuxième génération parmi lesquelles, on compte :

- Le nilotinib, indiqué en phase chronique chez le patient naïf et en deuxième ligne en phase chronique et accélérée, chez le patient résistant ou intolérant à l'imatinib. À noter que le nilotinib est efficace contre 32 des 33 formes mutantes de la kinase BCR-ABL induisant une résistance à l'imatinib. Cependant la mutation T315I confère une résistance au nilotinib. [23]
- Le dasatinib indiqué en deuxième ligne en phase chronique et accélérée résistant ou intolérant à l'imatinib. Il permet notamment de contourner le mécanisme de résistance induit par la famille des kinases SRC. La mutation T315I confère également une résistance au dasatinib. [23]
- Le bosutinib indiqué en deuxième ligne en phase chronique et accéléré, lorsque l'utilisation des ITK tels que l'imatinib, le nilotinib et le dasatinib ne sont pas des traitements appropriés. Selon le rapport d'étude de l'ANSM, le bosutinib ne montre pas d'avantage clinique démontré dans la prise en charge de la LMC, (ASMR = V). La mutation T315I confère une résistance au bosutinib

- Le ponatinib indiqué en phase chronique et accéléré, chez les patients présentant une résistance ou une intolérance au nilotinib et au dasatinib et pour qui un traitement à l'imatinib n'est pas cliniquement approprié ou présentant la mutation T315I. Le ponatinib est le seul ITK efficace contre la mutation T315I de la kinase BCR-ABL.

L'étude STIM, en 2010 a démontré que 40% des patients qui présentent une réponse moléculaire complète pendant une période minimale de 2 ans peuvent arrêter tout traitement sans récurrence. [41]

### c. Les anti-angiogéniques dans le cancer du rein métastatique

L'avènement des TC a profondément bouleversé la prise en charge du cancer du rein au stade métastatique (mRCC) [22]. Elle constitue une révolution thérapeutique moins notable que les deux précédentes, du fait de l'amélioration simultanée des techniques chirurgicales (laparoscopie, robotique), des thérapies ablatives (radiofréquence et cryothérapie) et du fait des résultats cliniques plus nuancés, mais qui a permis d'atteindre des situations de rémission complète dans un modèle complexe du stade métastatique [42]. Cela a remis en question la place de la prise en charge chirurgicale globale du cancer.

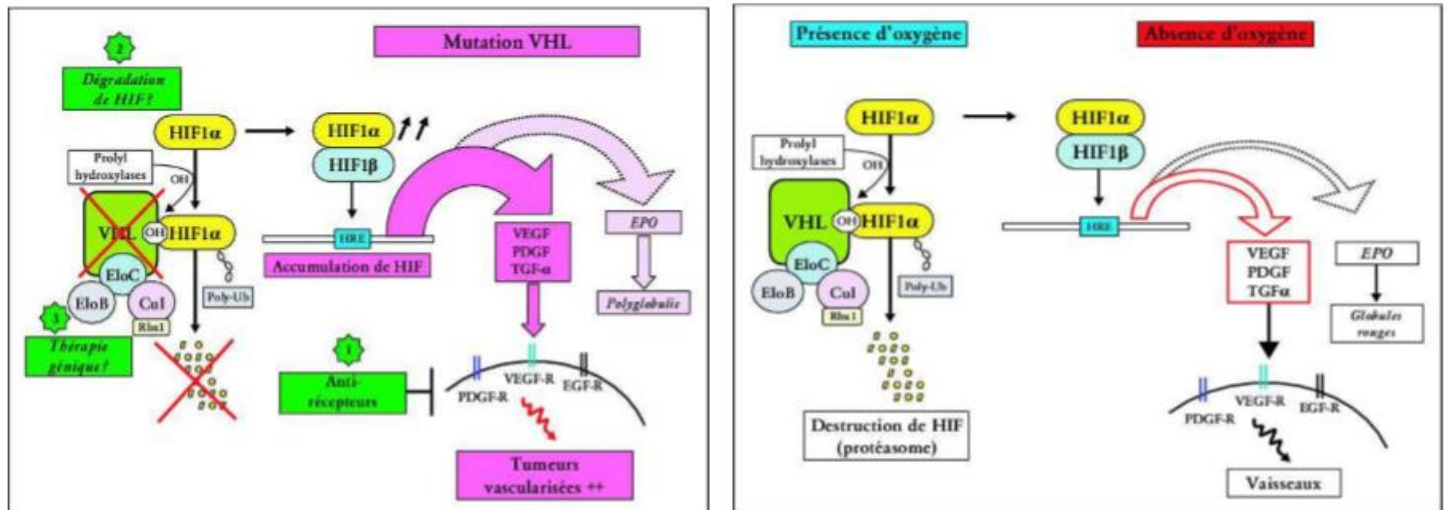
Jusqu'en 2006, les armes thérapeutiques disponibles étaient très limitées du fait du statut hormono- et chimio-résistant du mRCC. Le traitement de référence en première ligne reposait sur l'immunothérapie, basée sur l'utilisation de deux cytokines [43] :

- L'IFN $\alpha$ , conduisant à des taux de réponse globale de 10 à 15% dont 2 à 5 % de réponses complètes. La survie globale a été prolongée de 3 à 7 mois dans des essais de phase III randomisés contre placebo. [44,45]
- L'IL-2 en association avec l'IFN $\alpha$  a permis d'obtenir des résultats proches en dehors des taux de RC légèrement supérieur de 3 à 8% [46,47]

Il faut noter que l'utilisation de l'immunothérapie a prouvé son bénéfice en termes de survie lorsqu'elle était administrée après une intervention chirurgicale dite de néphrectomie cyto-

réductive première [48,49]. De multiples régressions de lésions métastatiques, notamment pulmonaires, ont été constatées après l'intervention. Certaines théories évoquent que la tumeur se comporterait comme un « piège immunologique », séquestrant anticorps et lymphocytes et la rendant ainsi responsable d'une diminution de l'immunité, défendant l'hypothèse d'un effet immuno- régulateur [50], voire un effet anti-angiogénique propre [51] de la néphrectomie cytoréductrice.

La découverte de l'altération du gène suppresseur de tumeur VHL (en référence à la maladie héréditaire Von Hippel Lindau) et son rôle dans l'initiation de l'angiogenèse a permis de comprendre une donnée fondamentale de la biologie tumorale rénale. La mutation de ce gène, semble être l'évènement précoce de la transformation tumorale retrouvée dans 60 à 80% des formes sporadiques [52]. Elle entraîne la production d'une protéine pVHL inactive, induisant une levée de la répression de la voie de la signalisation du VEGF, mimant une situation d'hypoxie tissulaire. (Figure 6)



**FIGURE 6** : Rôle du gène VHL dans la réponse tissulaire à l'hypoxie en présence d'oxygène, en absence d'oxygène et en cas de mutation du gène VHL [53].

Le VEGF sécrété par la cellule tumorale va venir fixer le VEGFR de l'endothélium ce qui induit un phénomène de « switch angiogénique » de la cellule endothéliale qui passe d'un statut quiescent à un statut prolifératif. C'est cette voie moléculaire qui est mise à profit dans l'utilisation des TC dans le mRCC.

Le cancer du rein est réputé être une tumeur hypervascularisée. De ce fait, il représente un modèle de tumeur dépendant de l'angiogenèse.

Les anti-angiogéniques s'intègrent dans une stratégie thérapeutique singulière. Ce n'est plus la cellule cancéreuse avec ses anomalies moléculaires qui sont ciblées ici mais son microenvironnement permettant son intendance, c'est-à-dire l'endothélium vasculaire nouvellement formés pour subvenir aux besoins métaboliques anormalement élevés de la tumeur. En 1<sup>ère</sup> ligne du mRCC, nous comptons [22-24] :

- Le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF circulant, et déjà approuvé dans la prise en charge des cancers colorectaux métastatiques en 2004 est historiquement la première TC utilisée dans le mRCC. Associé à l'IFN $\alpha$  en première ligne, il a montré dans l'étude de phase III AVOREN, une augmentation de la survie sans progression (SSP), du taux de réponse (TR) et de la survie globale (SG) comparé à l'IFN $\alpha$  en monothérapie. [54, 55]. Les résultats de l'étude sont résumés dans le Tableau 8. L'intérêt réel de la cytokine est cependant remis en question dans certaines études, même si aucun résultat en monothérapie n'est disponible.

	IFN	Bévacizumab/IFN
SSP (mois)	5,2	8,5
Valeur de p	p< 0,0001	
TR (%)	13,1	25,5
Valeur de p	p< 0,0001	
SG (mois)	17,4	18,3
Valeur de p	Non significatif	

**TABLEAU 8** : Résultats de l'étude AVOREN [55]

- Le sunitinib est le premier inhibiteur tyrosine multi-kinase utilisé dans la prise en charge du mRCC. Il développe une activité anti-angiogénique en ciblant les 3 formes du VEGFR mais également des récepteurs PDGF- $\alpha$  et - $\beta$ , c-KIT (stem cell factor receptor), et FT3 (fetal liver tyrosine kinase receptor) [22]. L'étude de phase III [56] a comparé le sunitinib à l'IFN $\alpha$  en première ligne métastatique. Les patients qui ont bénéficié du traitement par sunitinib ont rapporté une qualité de vie significativement meilleure par rapport aux patients traités par IFN $\alpha$  selon le schéma d'une dose quotidienne 50 mg pendant 2 semaines consécutives suivie d'une fenêtre thérapeutique de une semaine (schéma 2/1). [57]
- Le pazopanib, est également un inhibiteur tyrosine multi-kinase. L'étude princeps [58] sur laquelle repose l'AMM européenne a été publiée en 2010 et repose sur la comparaison de 2 bras : Pazopanib vs. Placebo plus ou moins traité préalablement par IFN $\alpha$ . En 2016, dans le cadre des nouvelles stratégies immuno-oncologiques, le pazopanib est en cours d'essai clinique en association avec un anticorps monoclonal anti-récepteur PD-1, le pembrolizumab. (NCT02014636)

Les résultats de l'étude de phase III du sunitinib conduite par Motzer et al. et du pazopanib conduite par Sterner et al. sont résumés dans le Tableau 9.

	Etude de phase III - Sunitinib		Etude de phase III - Pazopanib	
	Sunitinib (n=375)	IFN $\alpha$ (n=375)	Pazopanib (n=290)	Placebo (n=145)
SSP (mois)	11	5	9,2	4,2
Valeur du p	p < 0,001		p<0,001	
Hazard Ratio	0,42		0,46	
SG (mois)	26,4	21,8	22,9	20,5
Valeur du p	p = 0,052		p<0,001	
Hazard Ratio	0,821			
TR (%)	47	12	30	3

**TABLEAU 9** : Résultats des études de phase III [56] et [58]

En 2<sup>ème</sup> ligne, deux anti-angiogéniques sont actuellement disponibles [23] :

- Le sorafenib, après échec d'une immunothérapie, cible les mêmes kinases que le sunitinib. Il a conduit à une augmentation de la survie sans progression sans amélioration de la survie globale. [59] Cet essai de phase III randomisé TARGET, est la première étude ayant montré qu'un inhibiteur du VEGFR pouvait augmenter la survie sans progression des patients avec un cancer du rein avancé.
- L'axitinib est un ITK de 2<sup>ème</sup> génération montre une affinité 400 fois plus forte que ses prédécesseurs de première génération dans les essais pré-cliniques. Selon une étude de phase III [60] l'axitinib montre un bénéfice en 2<sup>ème</sup> ligne par rapport au sorafenib

Les résultats de l'étude de phase III TARGET du sorafenib conduite par Escudier et al. et de l'axitinib conduite par Sterner et al. sont résumés dans le Tableau 10.

	Etude de phase III - Sorafenib		Etude de phase III - Axitinib	
	Sorafenib (n=451)	Placebo (n=452)	Axitinib (n=361)	Sorafenib (n=362)
SSP (mois)	5,5	2,8	8,3	5,7
Valeur du p	p < 0,01		p < 0,0001	
Hazard Ratio	0,44		0,656	
SG (mois)	19,3	15,9	20,1	19,2
Valeur du p	p = 0,02		p = 0,3744	
Hazard Ratio	0,77		0,969	
TR (%)	10	2		

**TABLEAU 10** : Résultats des études de phase III [59] et [60]

Le mRCC, réputé immunogène a récemment fait l'objet d'essais cliniques sur les nouveaux agents de l'immunothérapie spécifique dont le nivolumab (anti PD-1). [61]

Le cancer du rein bénéficie d'un niveau de connaissance supplémentaire sur sa biologie tumorale et ses mécanismes oncogéniques, associé à la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et sa voie de signalisation PI3K/AKT. Cette protéine fonctionne comme un

intégrateur des signaux de disponibilités des nutriments/énergie/potentiel red-ox. Il contrôle par ce biais la synthèse protéique, le passage en phase G1 du cycle cellulaire et régule la transcription des Facteurs Inductibles par Hypoxie HIF-1 $\alpha$  et  $\beta$  (FIH) à l'origine du VEGF sécrété par la cellule tumorale. Ainsi, le temsirolimus en 1<sup>ère</sup> ligne et l'évérolimus en 2<sup>ème</sup> ligne sont les deux inhibiteurs de la protéine mTOR actuellement disponibles agissant comme des anti-angiogéniques, cette fois directement sur la cellule tumorale rénale [22, 23].

En une décennie, le mRCC a bénéficié d'un nouvel arsenal thérapeutique qui a bouleversé la prise en charge globale de la maladie et a redéfinie la place et l'intérêt de la néphrectomie. À la différence de l'immunothérapie, les TC ont démontré une réelle augmentation des taux de réponses objectives sur les métastases et sur la tumeur primitive, si bien que la balance bénéfice/risque en faveur de l'intervention chirurgicale est incertaine. De nombreuses études sont en cours d'évaluation afin de répondre aux points de controverses qu'a amené l'utilisation des TC [62]:

- La place de la néphrectomie en situation métastatique
- L'intérêt d'un traitement adjuvant dans les situations à haut risque de récurrence
- La place pour un traitement néoadjuvant dans les formes localement avancées
- Le choix de la première ligne de traitement
- Les différents schémas thérapeutiques et leurs conséquences sur la qualité de vie et l'apport éventuel de l'imagerie fonctionnelle dans l'évaluation de l'efficacité des TC

#### d. Les TC anti-EGFR et ALK dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBPNC)

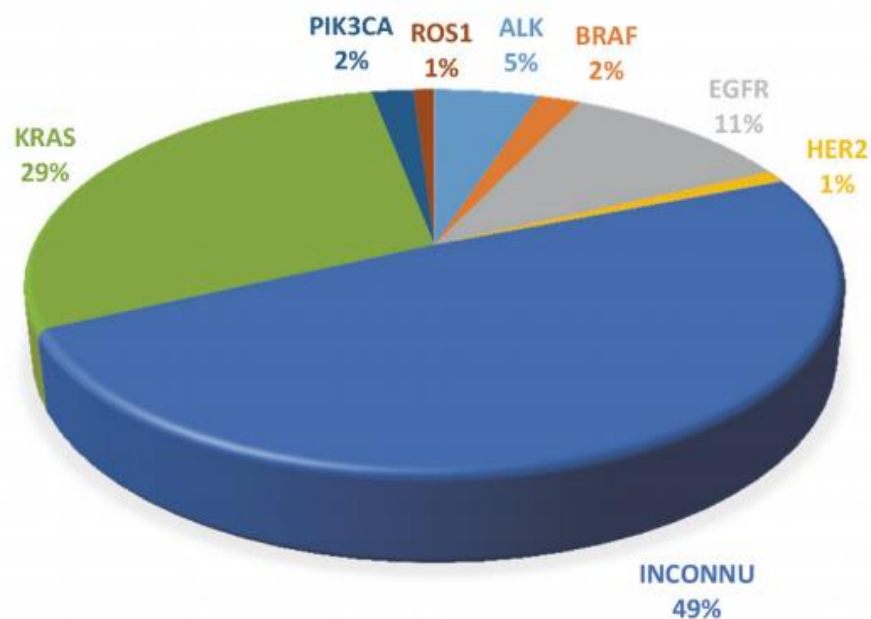
À l'instar du mRCC, le CBNPC a largement bénéficié des découvertes fondamentales sur la biologie tumorale et sur l'identification des mutations précoces, « *drivers* » impliquées dans l'oncogenèse, jouant le rôle d'addiction oncogénique pour la tumeur. Elles ont conduit à une lecture moléculaire incontournable de la maladie tumorale, venant s'ajouter aux critères anatomiques et histologiques et permettant un traitement « à la carte » à un maximum de patients.

En 2006, l'Institut National du Cancer a lancé le projet de grande envergure BIOMARQUEURS dont l'objectif est de décrire les caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs bronchiques et de connaître l'impact de ces analyses sur la prise en charge des patients sur le plan thérapeutique. Entre l'année 2012-2013, quelques 18 679 analyses ont été réalisées permettant une cartographie moléculaire du CBNPC sur 28 plateformes réparties sur toute la France. [63]

Le démantèlement moléculaire des CBNPC (85% des cancers bronchiques totaux) a levé le voile sur un aspect mutationnel riche et complexe dont la moitié reste à ce jour inconnu.

Aujourd'hui, les mutations peuvent-être divisées en 2 catégories (Figure 8) [63] :

- Les mutations activatrices de récepteurs à activité tyrosine-kinase, la mieux connue étant celle de l'EGFR (délétion E746-E750 de l'exon 19 et L858R de l'exon 21 à 85%) mais également en proportion variable les mutations touchant HER2, BRAF, KRAS, PI3K et c-MET.
- Les mutations chromosomiques telles que réarrangements, inversions et translocations aboutissant à la création de gène de fusion dont la protéine kinase est constitutivement activée. Ce phénomène a été décrit pour les protéines ALK, ROS1 et récemment KIF5-RET.



**FIGURE 7** : Pourcentages des anomalies moléculaires détectées dans le CBNPC par l'étude Biomarqueurs France [63]



Dans le cadre d'une détection précoce de la pathologie tumorale, le ciblage de ces mutations a permis une augmentation ostensible de la SG et de la SSP. Ainsi l'aspect révolutionnaire du traitement du CBNPC réside dans la personnalisation croissante du traitement par l'identification mutationnelle de chaque patient. La technique de référence pour la recherche des mutations activatrices est le séquençage haut débit permettant d'étudier l'ADN cible, de façon rapide et exhaustive. [23] La méthode d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur tissu tumoral par une sonde permet de visualiser les réarrangements ou translocations du gène ALK. Actuellement, seule la recherche des mutations de l'EGFR, BRAF, HER2 et des réarrangements du gène ALK sont effectuées en routine mais elle tend à se généraliser pour les autres biomarqueurs émergents : cMet, ROS1, et PDL-1. [23] Il n'y a pas de traitement disponible pour les patients avec un CBNPC muté sur PI3K, TP53 ou KRAS : la recherche de ces mutations n'est donc pas recommandée en routine, mais seulement dans le cadre de panels multiplexés si le patient peut être inclus dans des études cliniques basées sur la présence de ces biomarqueurs.

À l'heure actuelle, 9 TC ont une AMM dans le CBNPC aux stades métastatiques :

- En première ligne [24] :
  - Le bévacicumab peut être proposé en association à une chimiothérapie à base de sels de platine des lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde (et en l'absence de contre-indication).
  - L'erlotinib seul, quel que soit l'histologie, avec l'aspect mutationnel de l'EGFR prouvé requis.
  - Le géfitinib, seul, avec l'aspect mutationnel de l'EGFR prouvé requis, des lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde.
  - L'afatinib seul, uniquement lorsqu'une mutation activatrice de l'EGFR est avérée et que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde
  - Le pembrolizumab, une immunoglobuline dirigée contre le récepteur PD-1, administré en monothérapie dès lors que tumeurs expriment PD-L1 avec un score de proportion tumorale (TPS)  $\geq 50$  %, sans mutations tumorales d'EGFR ou d'ALK, ou un TPS  $\geq 1$  %, et ayant reçu au moins une chimiothérapie antérieure. [64]

- En deuxième ligne :
  - L'erlotinib seul, quelque soit l'histologie, avec l'aspect mutationnel de l'EGFR non requise après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie à base de platine.
  - Le crizotinib seul ou en association avec un sel de platine, quelque soit l'histologie, uniquement lorsque le réarrangement ALK+ est avéré (et plus récemment pour le réarrangement du gène ROS1)
  - L'osimertinib seul ou en association avec un sel de platine, quelque soit l'histologie, uniquement lorsqu'une mutation activatrice T790M de l'EGFR est avérée qui rend la tumeur résistante à l'erlotinib, l'afatinib et au géfitinib.
  - Le nintetanib en association avec le docétaxel, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde, après échec d'une première ligne de chimiothérapie à base de platine.
  - Le nivolumab en monothérapie dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde, et ayant reçu au moins une chimiothérapie antérieure.
- En troisième ligne :
  - L'alectinib seul, quelque soit l'histologie, uniquement lorsque le réarrangement ALK+ est avéré, lorsque les patients ont été préalablement traités par crizotinib. L'alectinib pourrait entre autres diminuer la taille des métastases cérébrales fréquentes dans CBNPC ALK+.
  - Le céritinib quelque soit l'histologie, uniquement lorsque le réarrangement ALK+ est avéré, lorsque les patients ont été préalablement traités par Crizotinib.

Très récemment, le CBNPC a pu bénéficier de la mise sur le marché l'atézolizumab, inhibiteur PD-L1 (ligand de PD-1) de la classe de l'immunothérapie spécifique. Il est indiqué dans les formes localement avancé ou métastatique après une chimiothérapie antérieure. Les patients avec mutations activatrices de l'EGFR ou réarrangement du gène ALK (ALK-positif) doivent également avoir reçu une thérapie ciblée avant de recevoir l'atézolizumab. [65]

Etudes	TC	vs. Chimiothérapie	SSP (HR[IC95%]) en mois		SG (HR[IC95%]) en mois	
EURTAC	Erlotinib	Gemcitabine - Docetaxel	9,7	5,2	19,3	19,5
OPTIMAL		Carboplatine-Gemcitabine	13,1	4,6	22,7	28,9
ENSURE		Cisplatine-Gemcitabine	11	5,5	26,3	25,5
NEJ002	Gefitinib	Carboplatine-Paclitaxel	10,8	5,4	27,7	26,6
WJTOG3405		Cisplatine-Docetaxel	9,2	6,3	36	39
IPASS		Carboplatine-Paclitaxel	9,5	6,3	21,6	21,9
FIRST-SIGNAL		Cisplatine-Gemcitabine	8,4	6,7	30,6	26,5
LUX-LUNG 3	Afatinib	Cisplatine-Pemetrexed	11,1	6,9	28,2	28,2
LUXLUNG 6		Cisplatine-Gemcitabine	11	5,6	23,6	23,5

**TABLEAU 11** : Essais de phase III ayant évalué, en comparaison de la chimiothérapie, les 3 principaux ITK en première ligne dans une population de patients mutés EGFR. [66-74]

Que ce soit le gefitinib, l'afatinib ou l'erlotinib, en cas de mutation activatrice de l'EGFR, il existe donc une supériorité des ITK ciblant l'EGFR sur la chimiothérapie à base de sels de platine en termes de taux de réponse objective, de SSP, de toxicité et de qualité de vie en première ligne. (Tableau 11) [66-74]. Dans ces études, les ITK sont administrés jusqu'à progression ou toxicité. L'utilisation de la chimiothérapie en première ligne est justifiée lorsque le statut mutationnel est difficile à obtenir, long, ou lorsqu'il existe une menace vitale ne permettant pas d'attendre les résultats de l'analyse. Les ITK pourront alors être administrés en seconde ligne ou en maintenance. Ils peuvent être utilisés en première ligne même chez les patients très altérés, avec une amélioration souvent rapide de l'état général.

#### e. L'immunothérapie et inhibiteurs BRAF dans le traitement du mélanome métastatique

Le mélanome représente 10% des cancers cutanés mais il est responsable de 80% de la mortalité de ce type de cancer. Au stade métastatique, il est réputé agressif et très résistant aux chimiothérapies conventionnelles, avec un taux de réponses inférieur à 10% et une survie médiane de 6 à 9 mois. [75] Ces dernières années, la compréhension et la prise en charge de la maladie ont été nettement améliorées, grâce à l'identification des mutations oncogéniques « drivers » responsables de l'addiction oncogénique.

Avant l'utilisation des TC et du profilage moléculaire tumorale, le traitement du mélanome métastatique reposait sur 3 options [22,24] :

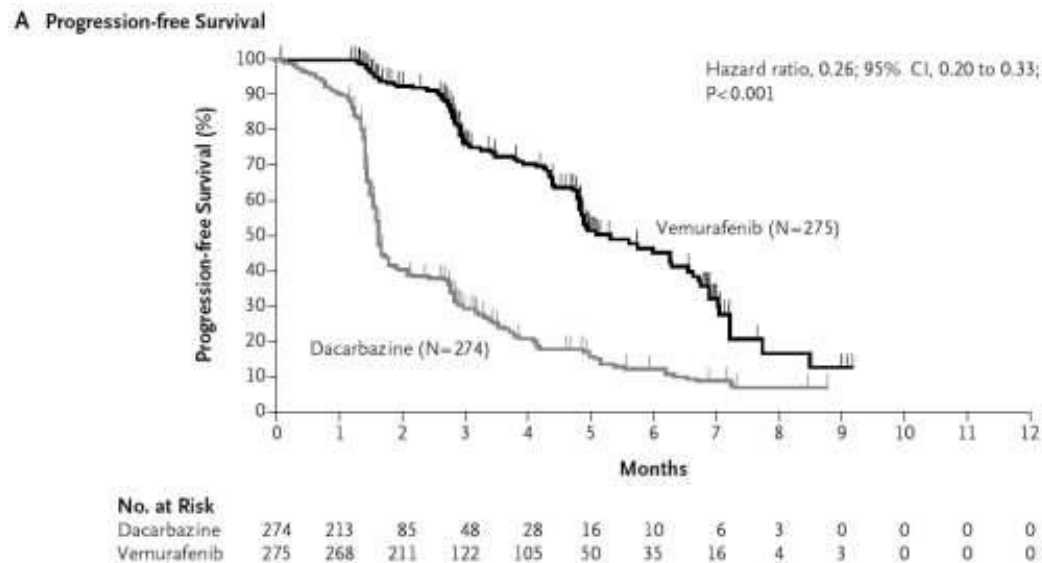
- La chimiothérapie compte la dacarbazine et la fostémustine, comme les molécules les plus utilisées dans cette indication. Elles entraînent un taux de réponses avoisinant les 20% et un taux de rémission entre 5 et 12%. Plusieurs combinaisons d'agents chimiothérapiques (nitroso-urées – taxanes – poisons du fuseaux) ont été évalués sans amélioration du taux de réponse, condition pour accepter l'accroissement de toxicité qu'elles engendrent.
- L'interferon- $\alpha$  forte dose engendre un taux de réponse inférieur à 15%. De fortes doses de l'IL-2 ont permis d'atteindre un taux de réponses de 20% et un taux de rémissions avoisinant les 5%. Cependant il est associé à une forte toxicité quelque soit son schéma d'administration. De ce fait seul un groupe de patient soigneusement sélectionné devrait être considéré pour un traitement IL-2 forte dose. [76]
- Les combinaisons chimiothérapie-immunothérapie n'ont pas démontré qu'elles apportaient des bénéfices en termes de survie globale. De ce fait, les mono chimiothérapies ou les mono immunothérapies sont préférées aux poly chimiothérapies ou aux poly chimio-immunothérapies. [77,78]

## i) Inhibiteurs de BRAF

C'est la découverte d'un site muté sur la serine-thréonine kinase BRAF, retrouvé dans 50% des mélanomes qui a marqué l'entrée du traitement du mélanome métastatique dans une nouvelle ère thérapeutique. Cette mutation activatrice est 9 fois sur 10, la V600E (substitution d'une valine par le glutamate en position 600) sur le site kinase [79]. Elle conduit à une activation constitutive de la voie MAPK impliquée dans la prolifération, la croissance cellulaire et l'angiogenèse. Les ITK inhibiteurs de BRAF ciblent cette anomalie.

Le sorafenib est le premier ITK ciblant RAF, à avoir été testé dans les essais cliniques de traitement du mélanome métastatique. C'est un inhibiteur de RAF-1 qui a aussi une légère activité anti BRAF. Son efficacité a été démontrée dans d'autres pathologies telles que dans les carcinomes hépatocellulaires et rénaux. Mais sa dose efficace contre la mutation de BRAF dans le mélanome métastatique est très supérieure à sa dose toxique. De ce fait la molécule n'a pas été retenue cette indication [80, 81].

Le vémurafenib ZELBORAF appartient à une deuxième génération de molécules inhibant beaucoup plus sélectivement BRAF que le sorafenib. Il est indiqué dans le mélanome non résecable ou métastatique présentant la mutation <sup>V600E</sup> BRAF et il est sur le marché depuis 2012. L'objectif de la Phase III, multicentrique randomisée était d'évaluer l'efficacité du vémurafenib face à la dacarbazine dans le traitement du mélanome métastatique exprimant la mutation V600E BRaf. Le taux de réponse pour le bras vémurafenib a atteint 48.6% vs. 5.5% pour le bras dacarbazine ce qui montre une réelle avancée dans le traitement du mélanome métastatique (Figure 8) [82]. Il constitue à ce jour le meilleur traitement en premier ligne thérapeutique pour les patients atteints du stade III ou IV porteurs de la mutation <sup>V600E</sup> BRAF.



**FIGURE 8 :** Survie sans progression avec le vémurafenib ou la dacarbazine dans l'étude BRIM III [82]

Cependant, il est impératif de déterminer le statut mutationnel du mélanome métastatique avant de mettre en place ce traitement [83]. La détection de la mutation <sup>V600E</sup>BRAF est réalisée in vitro par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative [23]

L'identification du profil biologique mutationnel du mélanome à un triple impact en pratique clinique :

- Une stratification pronostique : les mutations identifiées sont corrélées à une agressivité tumorale
- Une orientation de l'arsenal thérapeutique
- Une classification étiologique : les mutations identifiées sont corrélées à la localisation cutanée et au degré d'exposition aux U.V.

## ii) L'immunothérapie

La deuxième avancée majeure dans le traitement du mélanome métastatique est une approche immunologique. Il s'agit de l'ipilimumab, un anticorps monoclonale anti-CTLA4, un antigène exprimé à la surface des lymphocytes T (LT) qui a une activité régulatrice négative

sur l'activation primaire des LT. Par sa fixation sur CTLA-4, l'ipilimumab stimule l'activité immunitaire anti-tumorale des LT qui vont proliférer, infiltrer la tumeur, attaquer les cellules cancéreuses et provoquer leurs lyses [84]. Deux phases III (l'une associée à la dacarbazine, l'autre en monothérapie) ont confirmé l'effet bénéfique notable de l'ipilimumab sur la survie à long terme. Depuis l'ipilimumab a obtenu une AMM en juillet 2011 en monothérapie chez les patients ayant déjà reçu un traitement.

Dans la 1<sup>ère</sup> phase III l'association ipilimumab/dacarbazine vs. Placebo/dacarbazine évaluait l'ipilimumab en 1<sup>ère</sup> ligne.

Dans la 2<sup>ème</sup> phase III, tous les patients ont déjà bénéficié de premières lignes de traitement par dacarbazine, témozolomide, fostémustine, carboplatine ou IL-2 (évaluation en 2<sup>ème</sup> ligne). L'essai évaluait l'ipilimumab vs. le gp100, un vaccin expérimental. Les résultats de ces 2 essais cliniques montrent un bénéfice en termes de survie globale et de survie sans progression pour l'ipilimumab. [85, 86]

Un autre agent de l'immunothérapie spécifique, obtient l'AMM pour le mélanome avancé en Juin 2015. Il s'agit du nivolumab, un anticorps monoclonale anti-PD1 déjà autorisé en 2<sup>ème</sup> ligne dans le CBNPC. Il a fait l'objet de 3 phases III :

- vs. dacarbazine chez les patients naïfs
- vs. dacarbazine ou carboplatine/paclitaxel en 2<sup>ème</sup> ligne
- vs. associé à l'ipilimumab vs. ipilimumab seul en 1<sup>ère</sup> ligne

Les résultats ont été globalement très positifs à la fois chez les patients naïfs (augmentation significative de la SG), prétraités (l'augmentation taux de réponse objective) et particulièrement marqués dans l'association avec l'ipilimumab. [87,88] Ces effets bénéfiques ont été confirmés pendant l'AACR de 2016 par une récente analyse d'anciens patients recrutés lors d'une phase I initiée en 2008 encore vivant 5 ans après avoir commencé le traitement, ce qui constitue un véritable record de longévité pour 34% d'entre eux. [89]

## B. LIMITES ET ENJEUX

Une amélioration très nette de la prise en charge des patients a pu être observée, avec l'utilisation des TC agissant sur des altérations moléculaires *drivers* de la tumeur. Cependant, les TC ne sont pas dépourvus d'inconvénients et bien que la recherche pharmaceutique ait massivement investi dans cette stratégie, elle soulève de nombreuses questions cliniques, éthiques, sociales et économiques qui remettent en question les systèmes de soins à l'échelle mondiale.

De manière synthétique l'utilisation des TC se confronte à trois inconvénients majeurs :

- Une réponse durable limitée par une résistance acquise
- L'émergence d'une toxicité
- Le coût très élevé et continuellement croissant

### 1. Les résistances acquises

Elle décrit une réponse thérapeutique initiale favorable (régression ou stabilité tumorale), pendant une durée variable, suivie d'un accroissement de la surface des lésions tumorales et/ou l'apparition de nouvelles lésions (selon les critères RECIST [90]) malgré un traitement bien conduit. On parle de pharmaco-résistance acquise. Elle s'oppose à une résistance « de novo » qui décrit l'absence d'une quelconque réponse clinique (la plupart du temps du fait de l'absence de la cible). Ainsi, les TC souffrent de la même limitation majeure que la chimiothérapie traditionnelle dans le cadre de la maladie métastatique : une réponse clinique durable contrariée par l'acquisition relativement rapide d'une pharmaco-résistance.

Selon certains auteurs l'obstacle fondamental pour développer des traitements durables dans le cancer est de surmonter « la robustesse » du cancer [91]. La robustesse est la capacité de résister aux perturbations, s'adaptant aussi bien aux variations imprévisibles qu'aux changements globaux avec une perte minimale de fonctionnalité. Dans le cas du cancer, il s'agit de la survie et de la prolifération des cellules tumorales qui utilisent le vaste réseau des voies de signalisations et les qualités de plasticité du génome pour déjouer l'effet anti-



prolifératif des TC, aboutissant à la résistance et une rechute des patients. De nombreuses publications s'accordent à ranger les mécanismes sous-jacents à la pharmacorésistance des TC en deux catégories [91,92] :

- les mécanismes génétiques
- les mécanismes non génétiques

#### a. Les mécanismes de résistances d'origine génétique

Les mutations génétiques conférant une résistance à la cible visée par les TC peuvent provenir de deux façons :

- soit la mutation est acquise par pression sélective pendant le traitement
- soit la mutation était présente avant le traitement et s'exprime en raison de celui-ci.

Les premières études menées sur la LMC résistante à l'imatinib comparaient le statut mutationnel des biopsies avant et après traitement. Dans ces études, les mutations conférant une résistance n'ont été trouvées que dans les échantillons post-traitement, suggérant son origine acquise [93,94] alors qu'une autre révéla le contraire. Ce fut la sensibilité de la méthode de détection qui fut mise en cause laissant entrevoir une prédisposition innée à la réponse du traitement. Le même travail a été mené sur les patients atteints de CBNPC, EGFR muté portant la mutation T790M. La recherche de cette mutation en prétraitement par une méthode ultra-sensible révéla sa présence chez 10 patients des 26 analysés (38%) [95]. Ceci suggère que la mutation T790M peut être un biomarqueur de prétraitement pour identifier les patients peu susceptibles d'obtenir des réponses durables sous ITK réversibles de l'EGFR.

La mutation conférant une résistance de la cible à la TC se manifeste de différentes manières en fonction :

- Du site fonctionnel muté de la cible
- Du potentiel oncogénique de la mutation
- De son caractère hétérogène intra et inter-lésionnel tumoral

Parmi les sites fonctionnels mutés, nous pouvons citer les résidus « *gatekeepers* » situés à l'arrière du site catalytique et entraînant dans un cas une gêne stérique pour la liaison de l'inhibiteur (mutation T315I et l'imatinib [96] et dans un autre cas une dissociation de la liaison de l'inhibiteur et de son activité inhibitrice par un changement d'affinité pour l'ATP (mutation T790M et le géfitinib). D'autres mutations touchent les structures de la conformation inactive de la cible, déplaçant l'équilibre de la forme inactive vers la forme active ou encore les sites allostériques empêchant la fixation de l'inhibiteur. D'une manière générale, c'est le site fonctionnel muté de la cible qui va décider de la stratégie biochimique à adopter et de la difficulté pour contourner les résistances.

Parmi ces mutations conférant une résistance, il existe une variation du potentiel oncogénique. Certaines d'entre elles développent un effet pro-tumoral au-delà de leur propre suractivation. C'est le cas de la mutation T790M de l'EGFR [97] qui entraîne d'une part une augmentation de l'activité catalytique du récepteur par rapport aux autres mutations et d'autre part une activation de la transcription du gène codant pour MET aboutissant à une augmentation du potentiel prolifératif et agressif de la tumeur. [98]

Cependant, l'avantage prolifératif d'un mutant donné apparaît être multifactoriel et dépendre à la fois de l'activité kinase intrinsèque, de la spécificité du substrat et des facteurs extrinsèques comme les facteurs de croissance et les cytokines. [99]

Par ailleurs, ces mutations peuvent être hétérogènes entre les tumeurs et dans une même lésion tumorale compliquant lourdement la stratégie thérapeutique pour les contourner. On parle de polyclonalité tumorale. Des études ont montré que pour des patients traités pour tumeurs stromales gastro-intestinales par l'imatinib, [100] 6 patients sur 11 (67%) présentant 2 à 5 mutations secondaires différentes parmi les métastases et 3 patients (34%) ont portés deux mutations différentes KIT dans la même métastase. Ce phénomène a été retrouvé chez les patients atteints de CBNPC, traités par géfitinib où la mutation T790M a été retrouvée dans toutes les métastases sauf celles au niveau cérébral. [101]

Le traitement a pour effet d'éliminer les sous-clones sensibles, et sélectionne en même temps les clones les plus agressifs et les plus résistants. Dans la LMC par exemple, l'imatinib sélectionne le sous-clone T351I de BCR-ABL qui confère une résistance au médicament [102]

[22], Dans la leucémie lymphoïde chronique cependant, le traitement a un tout autre effet : il permet à de multiples sous-clones de s'étendre et accroît paradoxalement l'hétérogénéité apparente de la tumeur [103]. Le traitement pourrait donc perturber l'équilibre interne d'une tumeur dans laquelle les clones les moins agressifs contrôlent la croissance des clones plus agressifs. La sélection ou l'émergence de sous-clones résistants après traitement peuvent relever aussi de paramètres environnementaux, par exemple la localisation de cellules dans des zones d'hypoxie faiblement vascularisées, de paramètres liés à la cellule d'origine, tels que la résistance intrinsèque des cellules souches d'un tissu, de facteurs épigénétiques, ou de la mise en quiescence de certaines cellules du clone.

Il est donc important d'analyser l'hétérogénéité tumorale de manière dynamique et fonctionnelle [104]. L'analyse de l'évolution dynamique des tumeurs, repose sur l'examen des cellules tumorales circulantes ou de l'ADN tumoral circulant [105]. Il s'agit d'anticiper la sélection de clones résistants, de développer des stratégies permettant l'élimination des sous-clones réfractaires, ou d'exploiter la compétition entre les sous-clones pour stabiliser l'évolution d'une tumeur sans l'éliminer nécessairement. Il sera possible aussi de cibler le microenvironnement des sous-clones réfractaires pour moduler leur vascularisation, leurs ressources au sein du tissu ou la réponse immunitaire contre ces sous-clones [106].

Le Tableau 12 décrit les mécanismes génétiques à l'origine de la pharmacorésistance des TC les plus couramment utilisés en clinique.

Mecanisme génétique de la pharmacorésistance				
Cible	TC	Indication(s)	Mécanismes de Résistances	Bibliographie
EGFR	Erlotinib	CBNPC	amplification MET , T790M gatekeeper mutations, perte PTEN , mutations de domaines HER2 kinase , IGF1R	[107,108]
HER2	Trastuzumab	Sein	perte PTEN , SRC, AXL, EGFR, IGF1R, amplification cyclin E , erythropoïétine, HSP90, p95HER2, MUC4	[109-111]
MET	Crizotinib	GIST	mutations MET, protéine de fusion BRAF, EGFR	[112]
ALK	Crizotinib	CBNPC	mutations ALK secondaires , amplification ALK , EGFR, HSP90	[113]
BRAF	Vemurafenib, MEKi	Melanome, CCR	NRAS, CRAF, COT, PDGFR, IGF, aberrations de l'épissage BRAF, mutations MEK , amplification BRAF	[114]
MEK	MEKi	Melanome, CCR	mutations MEK1, amplification BRAF , amplification KRAS, PI3K	[115]
PI3K	PI3Ki	sein	Notch, Myc, MET	[116]
BCR–ABL	Imatinib, nilotinib	LMC	mutations secondaires BCR–ABL , amplification BCR–ABL, P-glycoprotein, MDR, LYN	[117,118]
KIT	Imatinib, sunitinib	GIST	mutations secondaires KIT, amplification KIT, MDR, AXL, FAK	[119]
ER	Thérapeutique Endocrine	Sein	PI3K, HER2, perte PTEN	[120]
AR	Antiandrogens	Prostate	mutations AR , amplification AR , variants d'épissage de AR, TMPRSS2–ERG, WNT, perte PTEN	[121]
Hh	Vismodegib, LDE225	Medulloblastome	mutations SMO, PI3K, cyclin D1	[122]

AR: Androgène récepteur; CML: Leucémie myéloïde chronique; CCR: cancer colorectal; ER: Estrogène récepteur; GIST: Tumeur gastro-intestinale du stroma; CBNPC : Cancer bronchique non à petite cellule PDGFR ; Hh : Hedgehog

**TABLEAU 12.** Mécanisme génétique de la pharmacorésistance des TC les plus couramment utilisés en clinique [92]

## b. Les mécanismes de résistances non génétiques

La pharmacorésistance aux TC d'origine non-génétique est plus bien difficile à élucider que l'origine génétique. Ceci est en grande partie due aux technologies peu performantes pour explorer les mécanismes non-génétiques tel que le rôle de l'épigénétique, l'épissage alternatif, et les modifications métaboliques. De ce fait, ces mécanismes font l'objet de nombreuses études et débats au sein de la communauté scientifique. On en dénombre actuellement six [92] :

### ➤ Switch de la voie d'addiction oncogénique

Ce phénomène repose sur un mécanisme de commutation de dépendance oncogénique d'une kinase suractivée à une autre avec des effecteurs partagés ou qui deviennent co-dépendants de plusieurs voies convergentes dans le vaste réseau des voies de signalisations. Dans la cellule tumorale, les voies de prolifération et de la survie cellulaire sont médiés par plusieurs voies, dont les kinases EGFR, HER2, MET et ALK. Ainsi l'inhibition d'un récepteur peut générer par un phénomène de compensation, un signal oncogénique « redondant » issue d'un autre récepteur via les mêmes effecteurs. Plusieurs cas de résistance relèvent de ce mécanisme dans la littérature : dans le cas du CBNPC avec réarrangement ALK traité par crizotinib, une résistance apparaît par hyperactivation compensatoire de la voie de l'EGFR [123]. Quant au CBNPC avec EGFR muté traité par géfitinib, une hyperactivation de MET expliquerait la résistance acquise. [124]

Cette résistance pourrait résulter d'une sélection de cellules cancéreuses rares avec un profil distinct d'engagement de la kinase, ou éventuellement d'un mécanisme épigénétique qui aboutit à la production autocrine d'un ligand pro-tumorale.

### ➤ Cross talk avec la voie oncogénique PI3K

Le cross talk ou « dialogue croisé » repose sur le vaste réseau des voies de signalisations oncogéniques présentant des nœuds clés tel que PI3K ou MAPK. Un signal oncogénique issu par exemple de l'EGFR, HER2, MET ou ALK va aboutir en cascade à l'activation de ces nœuds à des niveaux et dans des proportions différentes. Ce phénomène s'illustre en tant que

mécanisme de résistance dans les cancers du sein hormonodépendant. Des études sur le cancer du sein ER+ ont dévoilé, après révélation du profil protéomique, le rôle important pour la voie PI3K et mTOR dans la médiation de la résistance à la thérapie endocrinienne. [125]. Conformément à cette observation, un double inhibiteur PI3K / mTOR a empêché l'émergence de la résistance et a de plus, entraîné l'apoptose des cellules résistantes. [126]

Ce phénomène est retrouvé dans le cancer de la prostate. Les thérapies initiales sont axées sur le blocage des effets des androgènes, ou antagonistes AR. Bien qu'initialement efficaces, presque tous les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique développent une résistance et progressent vers un état de cancer de la prostate résistant à la castration [127]. Comme dans le cancer du sein ER+, le dialogue croisé avec la voie PI3K-AKT semble être un mécanisme important de résistance, en particulier par la perte du suppresseur de tumeur PTEN. [128]. De nombreux exemples ont été décrits dans lesquels la voie RAS-MEK et les voies PI3K montrent une régulation ascendante réciproque les unes des autres, réduisant l'efficacité thérapeutique d'un seul agent et suggérant une stratégie de combinaison thérapeutique [129].

#### ➤ Les boucles de rétroaction positive

Les voies de signalisation oncogénique présentent souvent des mécanismes homéostatiques robustes. Elles peuvent être régulées par des voies de rétroaction positive ou négative en fonction de la concentration de nœuds métaboliques clés. Ce phénomène peut se produire dans la majorité des cellules tumorales, contrairement à la commutation de dépendance des voies de signalisation. Dans le cas d'une inhibition ciblée d'un récepteur kinase oncogénique, la diminution du nombre des effecteurs phosphorylés va entraîner soit :

- une boucle de rétroaction positive régulant à la hausse la production de métabolites clés de la voie (facteur de transcription, voies de signalisation parallèles).
- la suppression d'une boucle de rétroaction négative assurant la régulation des nœuds métaboliques clés de la voie.

Un exemple a été décrit dans le contexte de la voie PI3K-AKT ; des études ont suggéré que la diminution de PI3K ou de AKT par des inhibiteurs sélectifs abroge les boucles de rétroaction négative et provoque une régulation à la hausse des composants de la voie de signalisation en amont, notamment les récepteurs TK tels que MET, EGFR et HER3. [130,131]. Cette hyper activation résultante de la signalisation en amont peut limiter l'efficacité d'inhibiteurs PI3K en monothérapie et suggère des combinaisons rationnelles avec des agents ciblant la signalisation en amont (antagonistes de HER2 / HER3).

➤ Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Ce phénomène physiologique décrit le passage réversible d'un groupe de cellules épithéliales vers une forme mésenchymateuse. Il apparaît essentiellement au cours du développement embryonnaire et du processus de cicatrisation et de fibrose. Les cellules au stade mésenchymateux se caractérisent par leur pouvoir migratoire et invasif.

Dans le cadre du développement tumoral, elles sont impliquées dans la dédifférenciation des cellules épithéliales, dans les premières étapes de la formation de métastases et présentent une résistance à une variété de médicaments anticancéreux. Au sein d'une tumeur, il semble exister un lien entre la proportion de cellules mésenchymateuses, et la réponse initiale au traitement et à la capacité à acquérir une résistance au traitement. C'est le cas du CBNPC où le caractère épithélial versus mésenchymateux des tumeurs peut prédire leur réponse aux inhibiteurs de l'EGFR. [132]

Cette transformation n'est pas associée à une altération génétique, mais peut être réversible, et semble être conduite par des mécanismes épigénétiques. La capacité des cellules tumorales à osciller potentiellement entre ces états phénotypiquement distincts pourrait conduire, sous pression d'un traitement, à la sélection de cellules mésenchymateuses, à travers un mécanisme non génétique. Cependant, il semble que la population mésenchymateuse peut, en fait, montrer une plus grande sensibilité à certains médicaments. [133]

➤ Epissage alternatif

L'épissage décrit un phénomène biologique de maturation d'un pré-ARNm transcrit en ARNm mature par excision des introns et de certains exons de manière alternative. Dans le cas de la résistance aux antagonistes des récepteurs aux androgènes, des altérations de l'AR lui-même ont été démontrées. L'étude de Dehm SM et al. [134] développe la théorie de l'épissage alternatif du récepteur qui peut aboutir à des isoformes tronquées qui sont constitutivement actives et fonctionnent comme des facteurs de transcription indépendants du ligand.

➤ Cellules souches tumorales

De nombreuses études attribuent aux cellules souches tumorales les propriétés de longévité de la tumeur et de plasticité à l'origine de la résistance aux traitements [135]. Une théorie récente révèle que ces cellules passent d'un état chimio sensible à un état résistant de manière réversible et transitoire due à l'état de leur chromatine distinct des autres cellules tumorales. En effet l'étude de Sharma SV et al. [136] a testé la chimiosensibilité des cellules souches résistantes aux TC d'abord avec, puis sans inhibition concomitante de l'histone désacétylase KDM5A. Les résultats ont rapporté une lente restauration de la chimiosensibilité des TC dans la sous population avec inhibition concomitante de l'histone désacétylase et laisse entrevoir un mécanisme de résistance d'ordre épigénétique.

Ceci a conduit à comparer les cellules souches et les cellules mésenchymateuses qui partagent des propriétés associées à la résistance aux médicaments. Certains marqueurs protéiques communs ont été trouvés dans les sous-populations, ce qui a conduit de nombreuses études à percevoir une relation probable entre ces phénomènes. [137]



D'autres mécanismes potentiels de résistances ont été rapportés, au sein des cellules souches tumorale :

- Une surexpression des protéines d'efflux de la famille ABC
- Une augmentation de l'activité de l'alcool déshydrogénase
- Une inhibition de l'apoptose par augmentation de l'expression des protéines de la famille IAP

Le Tableau 13 relève des exemples de mécanismes de résistances non-génétiques de quelques TC.

Mécanisme non-génétique de la pharmacorésistance				
Cible	TC	Indication(s)	Mécanismes de Résistances	Bibliographie
EGFR	Erlotinib	CBNPC	Addiction switching: IGF1R, MET	[138]
			TEM	[139]
			Cellules souches tumorales: reversible drug tolerance	[136]
BRAF	Vemurafenib	Melanome	Switch des voies d'addictions: IGF1R, EGFR (CRC)	[140]
HER2	Trastuzumab	Sein	Switch des voies d'addictions: IGF1R, EGFR, EGF-like ligands	[143]
MET	Crizotinib	GIST, CBNPC	Switch des voies d'addictions: EGF-like ligands	[112]
ALK	Crizotinib	CBNPC	Switch des voies d'addictions: EGF-like ligands	[123]
PI3K-AKT	MK-2206, XL-147	Sein	Pathway crosstalk: HER3	[131]
ER	Antiestrogen	Sein	Pathway crosstalk: PI3K	[125]
AR	Antiandrogen	Prostate	Pathway crosstalk: PI3K	[129]
AR	Antiandrogen	Prostate	TEM	[142]

**TABLEAU 13.** Mécanisme non-génétique de la pharmacorésistance des quelques TC [92]

## 2. La toxicité

Le concept de ciblage moléculaire vise en partie à améliorer la tolérance du traitement anti-cancéreux. Bien que de véritables progrès ont été réalisés dans la prise en charge des patients en comparaison à la chimiothérapie cytotoxique, l'utilisation des TC a conduit à l'émergence d'effets indésirables encore mal compris, pouvant nécessiter un arrêt du traitement malgré une efficacité incontestable sur la cible. Par ailleurs, ces effets indésirables sont souvent prédictifs de la réponse thérapeutique. Cette toxicité apparaît d'autant plus importante avec la multiplication des essais sur les combinaisons d'agents antitumoraux à la recherche d'un effet synergique. Elle nécessite une prise en charge thérapeutique qui vient s'ajouter aux traitements des comorbidités liées à l'âge du sujet. Cela conduit souvent les patients à un haut niveau de polymédication ce qui constitue un terrain très propice à la survenue d'interactions médicamenteuses, affectant essentiellement le métabolisme hépatique, par l'intermédiaire des phénomènes d'inhibition et d'induction enzymatique. De ce fait, l'utilisation des TC requiert une prise en charge pluridisciplinaire des patients avec outre l'oncologue, une collaboration avec le cardiologue, le néphrologue et le dermatologue afin de limiter au maximum la survenue de ces complications.

La plupart des études et référentiels cliniques ayant pour objectif de décrire la prise en charge et les moyens de préventions de ces effets indésirables font état de huit profils de toxicité. Nous les détaillerons brièvement. Puis nous regrouperons dans le Tableau 14 les cas où la toxicité secondaire à l'administration d'une TC impose un arrêt du traitement.

### a. Toxicités cardio-vasculaires [143-145]

Ils comprennent, dans des fréquences variables, l'hypertension artérielle (HTA), des troubles coronariens et thrombo-emboliques, des accidents hémorragiques, une insuffisance cardiaque congestive et un allongement de l'espace QT.

L'HTA et les accidents thrombo-emboliques se définissent comme un effet de classe des anti-angiogéniques. L'HTA est principalement due à l'inhibition de la production de NO et de Prostaglandine I<sub>2</sub>, normalement induite par le VEGFR-2. C'est un effet très fréquent, précoce

et dose dépendante, mais elle est généralement contrôlable par les traitements antihypertenseurs. Elle peut conduire à des atteintes rénales tel qu'une protéinurie modérée et plus rarement une insuffisance rénale aigue puis un syndrome néphrotique.

Une HTA pulmonaire a également été relevé du fait de l'inhibition de la voie Src kinase chez les patients traités par dasatinib.

Les accidents thrombo-emboliques ont été rapportés pour l'ensemble des anti-angiogéniques mais plus particulièrement pour le bévacizumab. L'hypothèse principale de cette toxicité reste l'induction possible d'une apoptose endothéliale et donc l'apparition d'un état d'hypercoagulabilité endovasculaire par exposition de la membrane basale de la paroi vasculaire au sang. [146] Dans le cas d'un accident artériel ischémique (AVC, IDM, AIT), le traitement doit être définitivement arrêté. Dans le cas d'un accident veineux, un arrêt du traitement est préconisé selon le grade. C'est le cas lors d'une thrombose veineuse profonde ou d'une embolie pulmonaire (grade 3).

L'insuffisance cardiaque concerne à la fois les anti-VEGR (sunitinib, sorafenib), les anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib) et certains inhibiteurs de la kinase BCR-ABL. Dans la majorité des cas il s'agit d'une baisse de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG), souvent majorée lorsqu'il y a association avec un cytotoxique. Lorsque la FEVG devient inférieur à 44% un arrêt du traitement s'impose jusqu'à récupération.

#### **b. Toxicités cutané-muqueuses [143,144,147,148]**

Ces effets indésirables très fréquents dans l'utilisation des TC ont un spectre de gravité assez large. La folliculite (ou rash acnéiforme) est l'une des manifestations cutanées les plus fréquentes qui touche 50 à 100% des patients. Elle décrit une éruption papulo-pustuleuse associée à un prurit qui se localise au niveau des zones séborrhéiques du visage, du cuir chevelu et du haut du tronc. Au niveau histologique il s'agit de lésions inflammatoires avec un infiltrat de polynucléaires neutrophiles. C'est un effet de classe des anti-EGFR, réversible, dose-dépendant et prédictif de l'efficacité du traitement.

Des modifications réversibles de la pilosité ont été révélées chez certains patients traités par TC. Le sorafenib est responsable de rares cas d'alopécie, tandis que le sunitinib et le pazopanib provoquent des modifications de la couleur des cheveux. Une hypertrichose a été signalée chez certains patient traités par erlotinib et cetuximab. Ces effets indésirables affectent peu l'état du patient mais l'impact psychologique peut-être important.

Les autres manifestations dermatologiques de faible gravité mais de fréquence importante sont la xérose, des fissures au niveau de zones épidermiques épaisses et une inflammation péri-unguéales. Elles concernent essentiellement les traitements sous anti-EGFR et anti-HER2. Leurs prises en charges sont relativement aisées.

Le syndrome main-pied peut s'avérer très handicapant en fonction de la forme qu'il prend. Il est caractérisé par des lésions hyperkératosiques qui peuvent être inflammatoire, bulleuse, desquamante ou mixtes. C'est un effet de classe des anti-angiogéniques, du lapatinib (anti-HER2) et des inhibiteurs de mTOR (temsirolimus, everolimus).

A partir d'un syndrome main-pied de grade 2, une adaptation posologique est nécessaire, tandis que le grade 3 impose un arrêt momentané du traitement avec reprise à demi-dose pendant au minimum 7 jours.

Notons que le vitiligo est l'effet indésirable le plus fréquent des nouveaux agents anti-PD1 et anti-PDL-1 selon un poster présenté à l'ASCO en 2015 [147].

### c. Toxicités digestives [143,144, 149,150]

Ces troubles sont très répandus parmi les TC. Sont concernés les anti-VEGFR, les anti-EGFR, les anti-HER2, les inhibiteurs de mTOR, et l'imatinib. Il s'agit essentiellement de nausées et vomissements, de diarrhées rarement sévères avec douleurs abdominales, de reflux gastro-œsophagiens et de brûlures épigastriques pouvant altérer l'absorption de certains ITK (géfitinib, lapatinib) et des mucites, aphtoses et candidoses. D'apparition plus rare, mais de gravité plus importante pouvant imposer un arrêt du traitement, il a été décrit des

perforations gastro-intestinales notamment sous anti-VEGF (bévacicumab) et des hémorragies et fistules digestives. Notons également une hépatotoxicité du lapatinib et du pazopanib du fait d'hépatites sévères.

Des colites auto-immunes ont été décrites sous immunothérapie spécifique (TC anti PD-1, anti PDL-1).

#### d. Troubles respiratoires [143]

Ils concernent certains anti-EGFR (erlotinib, gefitinib, cetuximab), les anti-VEGFR, les inhibiteurs mTOR, et le trastuzumab et l'imatinib. Ils se manifestent par une dyspnée, une toux, un syndrome pseudo-grippal et une douleur thoracique. Ce tableau clinique peut décrire une pneumopathie interstitielle non infectieuse. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette toxicité sont de type immunologique dans le cas des inhibiteurs mTOR alors qu'ils seraient dus à une absence de signalisation de l'EGF jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie alvéolaire dans le cas des anti-EGFR. Il n'existe pas de recommandations officielles sur les conditions d'arrêt du traitement. En pratique, elles sont donc laissées à l'appréciation de l'oncologue.

#### e. Toxicités rénales [143, 151-152]

Le profil de tolérance des TC anti-angiogéniques implique une toxicité rénale commune à toutes les molécules. Il apparaît des atteintes rénales de type protéinurie, parfois une insuffisance rénale et des atteintes parenchymateuses rénales de type microangiopathie thrombotique, glomérulopathie et néphropathie interstitielle. L'atteinte la plus recensée est la protéinurie secondaire à une HTA. Ces effets indésirables surviennent de manière dose-dépendante et sont réversibles après l'arrêt du traitement. Seule la microangiopathie thrombotique entraîne un arrêt thérapeutique anti-VEGFR jusqu'à restauration de la fonction rénale.

#### f. Toxicités médullaires [143,153,154]

Les TC peuvent augmenter la toxicité hématologique des chimiothérapies cytotoxiques lorsqu'elles sont utilisées en association. Une myélosuppression est retrouvée sous anti-bcr-abl, sous anti-angiogéniques, et sous inhibiteur mTOR. Les recherches sur les mécanismes physiopathologiques mettent en avant l'inhibition des récepteurs c-kit et Flt3 dont elles sont des cibles secondaires [45]. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules progénitrices hématopoïétiques et semblent contrôler en partie la croissance et la différenciation de ces dernières. Cette toxicité se manifeste par une anémie fréquemment macrocytaire, une thrombopénie et une leucopénie. Seule une thrombopénie qui est inférieure à  $50 \times 10^4/\text{mL}$  impose l'arrêt du traitement.

#### g. Troubles métaboliques et endocriniens [143, 155]

Au niveau endocrinien, les ITK anti-VEGFR et l'imatinib sont responsables de dysthyroïdie réversible et de survenue précoce. Il s'agit le plus souvent d'hypothyroïdie provoquée par le sunitinib. En cas de dysthyroïdie sévère, une adaptation de posologie est recommandée.

Au niveau métabolique, les inhibiteurs mTOR sont responsables de dyslipidémies de type hypercholestérolémies et hypertriglycéridémies réversibles et réagissant aux statines. Ils sont également responsables d'hyperglycémie qui pourra largement compliquer l'état du patient diabétique connu.

#### h. Troubles biologiques & généraux [143,144]

Ils concernent essentiellement une asthénie prolongée et une rétention hydrique de type œdèmes. Ces derniers, fortement associés à l'imatinib, sont essentiellement périorbitaires et superficiels de la face et des membres inférieurs. Bien que gênant pour le patient, ils sont facilement résorbables par des moyens médicamenteux.

En revanche, des cas d'œdèmes pulmonaires et d'épanchements pleuraux ou péricardiques ont été signalés sous TC anti-BCR-ABL et plus spécifiquement sous dasatinib. Lorsque ces manifestations atteignent un grade supérieur ou égale à 3, une réduction de posologie, voire un arrêt du traitement est recommandé.

Au niveau biologique, de nombreuses TC peuvent entraîner secondairement une élévation des enzymes hépatiques (transaminases, bilirubine et phosphatases). De ce fait, il est conseillé de surveiller la fonction hépatique lors d'un traitement par TC ayant un métabolisme hépatique. Une adaptation de posologie pourra être recommandée. Cependant selon certaines conditions biologiques, un arrêt du traitement s'impose lorsque :

- Les transaminases > 5 fois la limite normale supérieur
- La bilirubine totale > 3 fois la limite normale supérieur

Une exploration approfondie de la fonction hépatique permettra de déterminer l'origine des troubles biologiques. A noter qu'une élévation des phosphatases alcalines sans élévation des transaminases doit faire envisager des métastases hépatiques.

Le Tableau 14 résume l'ensemble des effets indésirables nécessitant un arrêt du traitement. Les TC sont souvent prises au long cours afin de maintenir un blocage des mécanismes oncogéniques. En conséquence, les patients sont exposés en continu à ces traitements. Il peut alors exister un effet cumulatif des événements indésirables, impactant significativement la qualité de vie des patients. Ce phénomène peut nuire à l'adhésion du patient à son traitement.

Nous noterons que de nombreuses TC pourvues d'une toxicité avérée n'ont pas été citées dans cette partie. D'une part parce que les mécanismes physiopathologiques de ces effets indésirables sont encore mal compris et/ou d'autre part, du fait de leur récentes utilisations, aucun consensus scientifique n'a été établi quant à leur prise en charge.

Sphère touchée par la toxicité	Symptômes nécessitant un arrêt momentané ou définitif du traitement	Thérapies Ciblées
Cardio-vasculaires	Accident artériel ischémique (AVC, IDM, AIT)	Anti-VEGFR : sorafenib, sunitinib, bevacizumab, pazopanib Anti BCR-ABL : ponatinib
	Accident thrombo-emboliques veineux de grade 3 et 4	
	Insuffisance cardiaque congestive	Anti-VEGFR : sorafenib, sunitinib, pazopanib. Anti-HER2 : trastuzumab, lapatinib
Dermatologique	Syndrome mains-pied	Anti-VEGFR : sunitinib, sorafenib, pazopanib. Anti HER2 : lapatinib
Digestive	Perforation et Hémorragie gastro-intestinale	Anti-VEGFR : sunitinib, sorafenib, pazopanib, bevacizumab.
Pulmonaire	/	/
Rénale	Microangiopathie thrombotique	Anti-VEGFR : sunitinib, sorafenib, pazopanib, bevacizumab.
Médullaire	Thrombopénie $< 50 \times 10^4$ plaquettes/mL	Inhibiteur mTOR : everolimus, temsirolimus, Anti-VEGFR : sorafenib, sunitinib, pazopanib
Métaboliques & endocriniennes	/	/
Biologique & Générale	Epanchement pleuraux et péricardique de grade 3 et 4	Anti BCR-ABL : imatinib, nilotinib, dasatinib. Anti-VEGFR : sunitinib
	Cœdème pulmonaire	
	Traduisant une atteinte hépatique sévère : Les transaminases $> 5$ fois la limite normale supérieur La bilirubine totale $> 3$ fois la limite normale supérieur	Anti-EGFR : erlotinib, gefitinib Anti BCR-ABL : imatinib, nilotinib, lapatinib

**TABLEAU 14** : Les effets indésirables nécessitant un arrêt thérapeutique sous TC.



### 3. Le coût

L'autre inconvénient majeur dans l'ère de l'utilisation des TC est son coût très élevé et continuellement croissant. Bien que ce phénomène touche spécifiquement l'oncologie, elle tend à s'appliquer à l'ensemble de la médecine moderne du fait du recours à la médecine de précision.

#### a. Historique

Avant l'avènement des TC et du concept de médecine personnalisée, l'accès aux progrès thérapeutiques n'a pas été l'objet de problème dans les pays les plus développés. [158] Il s'agissait essentiellement d'innovations techniques dont les coûts pouvaient être pris en charge par les systèmes de santé publique et les assurances privées. Cependant l'accès aux innovations thérapeutiques s'est compromis depuis quelques années aux Etats-Unis et dans les pays européens du fait de la convergence de trois facteurs [158] :

- Les médicaments sont maintenant directement concernés
- Les paradigmes définissant la maladie ont évolué
- la nature et les stratégies d'utilisations des traitements ont changé

La cancérologie est la pathologie la plus touchée par ces 3 facteurs [5].

La controverse entourant l'accès aux TC a commencé en 2008, aux Etats-Unis au cours d'un article du *New York Times* qui relatait l'exemple d'un anglais qui ne pouvait pas disposer du sunitinib (Sutent®) au motif que celui-ci était trop cher et pas assez efficace pour être autorisé en Angleterre. Ce même journal relatait quelques semaines auparavant les difficultés d'accès du bevacizumab (Avastin®) d'une patiente américaine. [156]

L'année suivante, en plein débat sur la réforme du système de santé américain (l'Obamacare) deux célèbres éditoriaux lançaient la polémique sur les conséquences éthiques et sociales du poids financier que représente l'accès à ces nouveaux traitements :

- L'un dans le New York Times concernant l'utilisation des TC en oncologie, posait : « *Est-il éthique de dépenser 54 000 dollars pour allonger une espérance de vie de quelques mois ?* » [156]
- L'autre dans le Journal of National Cancer Institute citait : « *...La prolongation de 12 mois de la vie des 550.000 américains qui décèdent du cancer représente 440 milliards de dollar par an...* » [157]

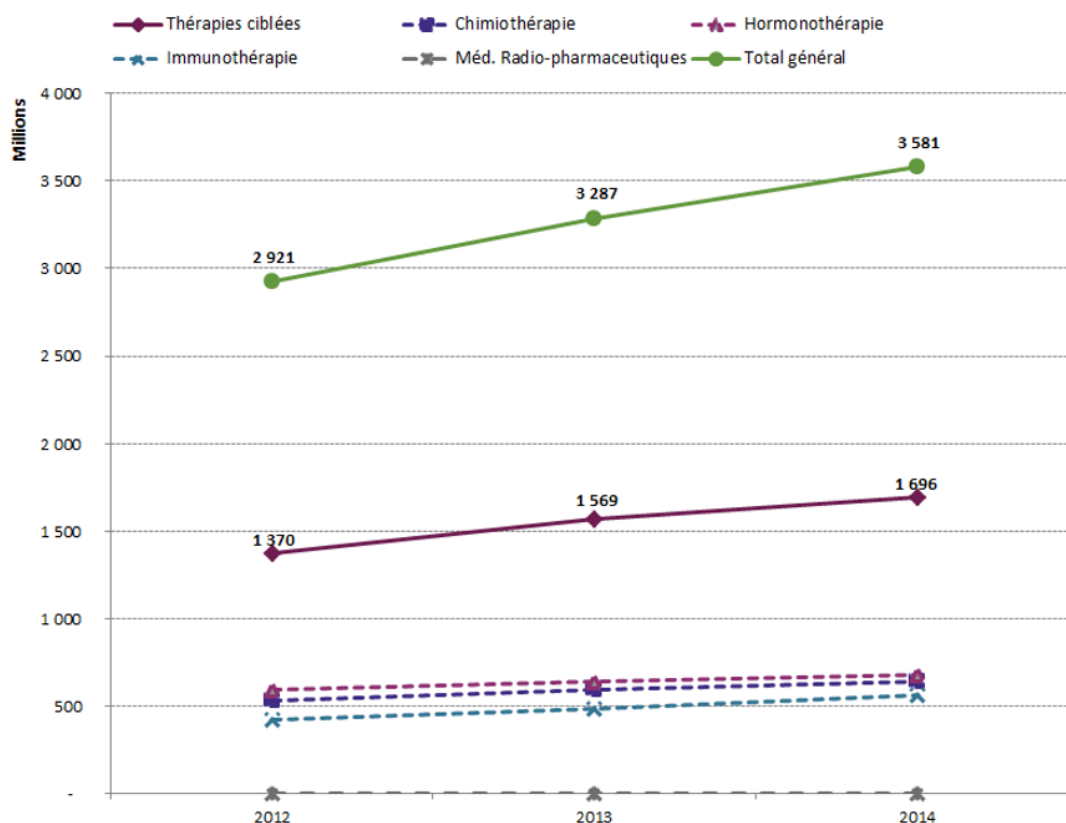
Au cours des années suivantes de nombreuses sociétés savantes américaines et journaux scientifiques ont évoqué le caractère « insoutenable » du prix du médicament en oncologie ce qui entraîna une polémique concernant la fixation des prix : le prix serait fixé non pas pour amortir des dépenses de recherche et développement mais en fonction de ce que le marché peut supporter [158].

En France, l'ensemble des acteurs de santé se sont, tour à tour, exprimés pour dénoncer les prix excessifs pour l'accès aux TC de ces dernières années et pour manifester leurs inquiétudes sur les potentielles répercussions éthiques et sociales au court et moyen termes.

#### b. Les chiffres en France (2012-2014) [5]

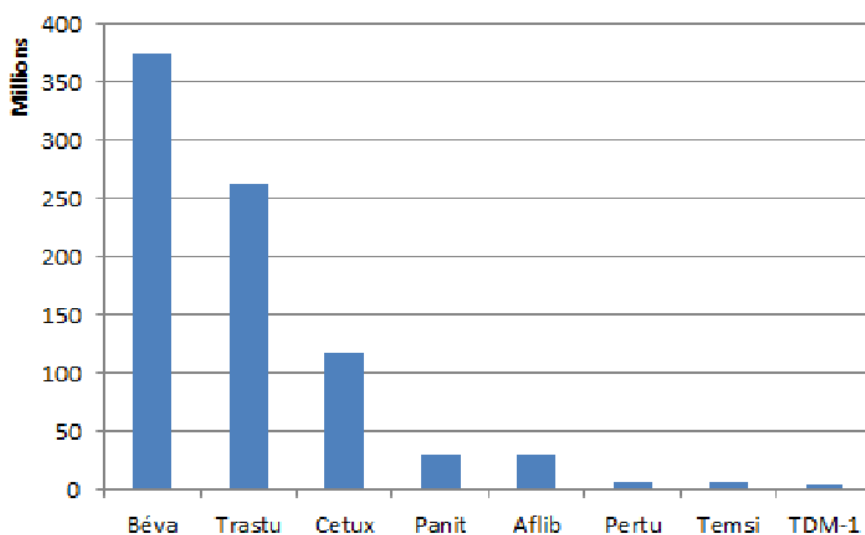
En 2014, les ventes des médicaments anticancéreux ont représenté 3,5 milliards (12,6%) sur un marché total de médicament estimé à 27,8 milliards d'euros dans tous les secteurs confondus (hôpital et ville) [159]. Parmi ces anticancéreux, la classe des TC correspond à 48,5 % des ventes sur la même années (1,70 milliard d'euros) soit une augmentation de +8,1 % par rapport à l'année 2013. Elle représente la classe thérapeutique anticancéreuse la plus vendue sur la période 2012-2014. (Figure 9)

En ville comme à l'hôpital, les coûts mensuels moyens d'acquisition des TC apparaissent relativement proches et élevés. Ils sont de 3 180 euros HT à l'hôpital et de 3 190 euros HT en ville, ce qui fait une moyenne de 35 000 euros par année tous secteurs confondus. Entre 1995 et 2013, ce coût mensuel moyen a augmenté de 10 % chaque année. L'escalade des prix est devenue la norme et systématiquement inflationniste. Cette moyenne tend à nettement augmenter avec l'arrivée de l'immunothérapie spécifique et les CAR-T.



**FIGURE 9** : Evolution des montants des ventes annuelles de médicaments anticancéreux en ville et à l'hôpital en millions d'euros sur la période 2012-2014. L'augmentation totale des ventes est essentiellement due à la croissance des ventes des TC.

Concernant le remboursement par l'assurance maladie, l'hôpital représente le secteur de dépenses liées à l'utilisation des TC le plus important. Sur l'année 2014, le montant des dépenses remboursées dans ce secteur représentent 51,2 % (soit 830,5 millions d'euros) sur l'ensemble des dépenses des anticancéreux (1,62 milliard d'euros), ce qui représente une évolution des dépenses de +2,7% par rapport à 2013. Les deux tiers de ces dépenses sont concentrées sur deux médicaments : le bévacizumab et le trastuzumab qui ont en 2014 respectivement généré 374,1 millions d'euros et 263,4 millions d'euros de dépenses de remboursement (Figure 10).

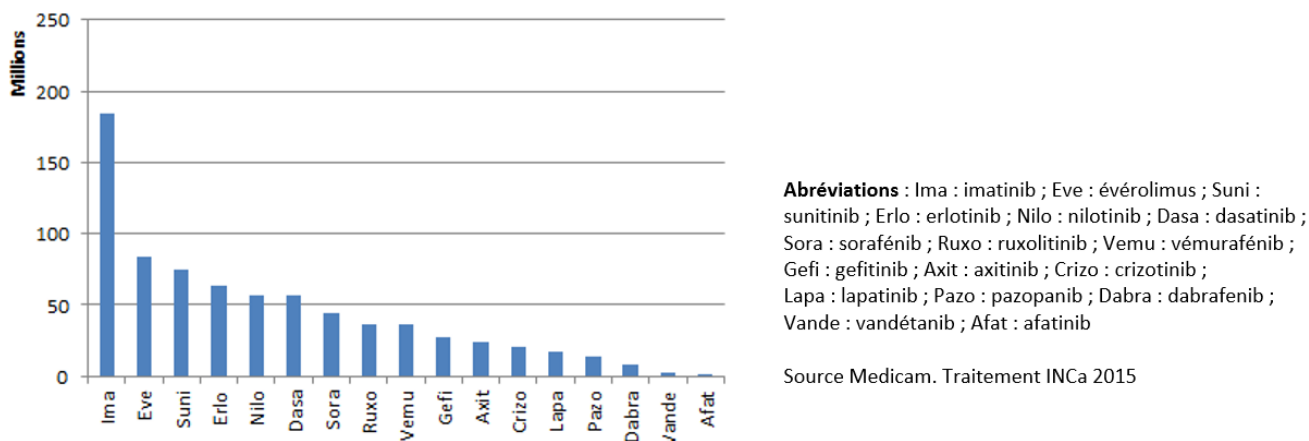


Abréviations : Beva : bévacicumab ; Trastu : trastuzumab ; Cetux : cétuximab ; Panit : panitumumab ; Aflib : Aflibercept ; Pertu : pertuzumab ; Temsi : temsirolimus ; TDM-1 : trastuzumab-emtansine

Source PMSI. Traitement INCa 2015

**FIGURE 10 :** Dépenses liées aux TC de la liste en sus dans le secteur hospitalier en 2014

Dans le secteur de l'officine le remboursement par l'assurance maladie des dépenses liées aux TC, représente 51,5 % des dépenses de l'ensemble des anticancéreux. Il représente une dépense plus faible en valeur absolue qu'à l'hôpital (753,2 millions d'euros) mais connaît néanmoins une croissance plus rapide que l'hôpital. C'est une évolution de 11,9 % par rapport à l'année 2013. L'imatinib est la TC qui est associée à la dépense la plus importante en 2014 avec 184,7 millions d'euros remboursés (Figure 11). L'imatinib figure parmi les dix spécialités pharmaceutiques disponibles en officine, les plus remboursées, [5] toutes classes pharmacothérapeutiques confondues. Il s'agit du seul médicament anticancéreux dans cette situation. Son impact budgétaire s'explique à la fois par son coût unitaire élevé et par le nombre important de patients sous traitement du fait d'une longue durée de réponse (stratégie de chronicisation de la maladie).



**FIGURE 11** : Dépenses liées aux thérapies ciblées dispensées en officine en 2014

### c. Problématique actuelle

Les thérapies anticancéreuses ont déjà vu leur prix doubler en 10 ans et les projections prévoient entre 8 % à 10 % de croissance par an, soit une augmentation de 1 à 1,2 milliards d’euros par an selon le Conseil Économique, Social et Environnemental (CESE) [159]. Un impact budgétaire prévisible susceptible de remettre en cause la capacité du système de soin Français à maintenir un accès à l’innovation et aux meilleurs traitements pour tous les patients. Une tendance qui n’est pas près de s’inverser et qui s’articule autour de 5 points :

- 1) L’augmentation des coûts unitaires moyens du fait d’un contexte constamment innovant. En France, en 2017, il faut payer de 60 000 et 90 000 € pour une année de traitement sous pembrolizumab (Keytruda®) pour des patients d’un poids de 60 à 80 kg, atteints d’un mélanome avancé non résécable ou métastatique ; de 50 000 à 70 000 € pour une année de traitement sous nivolumab (Opdivo®) pour des patients entre 60 et 80 kg cancer atteints de CBNPC type épidermoïde localement avancé ou métastatique et de 100 000 à près de 140 000 € pour une combinaison de traitements associé à l’ipilimumab (Yervoy®) dans le traitement du mélanome avancé non résécable ou métastatique.

- 2) Un changement du paradigme sur les traitements, qui reposait sur un assaut thérapeutique par chimiothérapie cytotoxique de quelques cycles vers des prises médicamenteuses au long cours, dans le but de maintenir la maladie résiduelle infraclinique et prévenir la récurrence. Ceci conduit à comparer le cancer à une maladie chronique, mais dont le prix du traitement n'est pas comparable.
- 3) La popularisation et l'accroissement du nombre de stratégies polythérapeutiques à la recherche d'un effet synergique optimal, ce qui a un effet multiplicateur sur le coût de la prise en charge.
- 4) Une augmentation du nombre de population cible visée par les thérapies innovantes. Jusqu'à il y a quelques années, les TC étaient réservées à des sous-groupes de population présentant une identité moléculaire spécifique. Mais la découverte de nouvelles cibles et des mécanismes communs à la carcinogénèse tendent à pouvoir traiter un nombre beaucoup plus grand de sous-population.
- 5) Une évolution très forte à prévoir. Deux types de traitement anticancéreux sont identifiés comme ayant un développement en plein essor par leur nombre d'essais cliniques en cours et sont susceptibles d'impacter fortement les dépenses de santé : l'immunothérapie spécifique que sont les anti-PD1 et anti-PDL1 et les CAR-T, des lymphocytes T génétiquement modifiés portant les récepteurs CAR ciblant divers récepteurs pro-tumoraux.[160] A titre d'exemple pour les CAR-T, le tisagenlecleucel commercialisé sous Kymriah® atteint le prix de vente astronomique de 450 000 euros. A cela viennent s'ajouter 89 molécules identifiées dans les pipelines pouvant avoir dans les deux à cinq prochaines années soit une autorisation de mise sur le marché soit une extension d'indication, dans les cancers aux très fortes incidences.

De ce fait, la crainte de voir se développer à court terme des restrictions d'accès au traitement et à l'innovation dans une pathologie mortelle a poussé de nombreux acteurs de santé américains et européens à manifester leurs inquiétudes.

Depuis quelques années les enjeux économiques des TC sont un sujet récurrent dans les congrès mondiaux d'oncologie. Ainsi le congrès de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) de 2015 a vu une session entière dédiée aux coûts du cancer qui portait de nom de « *Financial Toxicity* » [161]. En France, la ligue contre le cancer, l'Assurance maladie, les associations d'oncologie et bien d'autres acteurs de santé ont signalé leurs inquiétudes aux moyens de rapports, pétitions et propositions. La promotion d'une transparence dans la fixation des prix entre les payeurs des différents États et sur les déterminants du prix initial émis par le laboratoire (production, recherche et développement, investissements, prise en compte du pouvoir d'achat du pays), ainsi que l'anticipation des difficultés de soutenabilité financière sont aussi des sujets de réflexion à engager [158]. En France les actions 5.8 et 5.9 du plan cancer visent à faire évoluer les dispositifs de valorisation des médicaments anticancéreux et à anticiper l'impact économique de l'innovation pour garantir son accès à tous les patients dans la durée. [160]

## C. LES PERSPECTIVES EN IMMUNO-ONCOLOGIE

En oncologie, les innovations thérapeutiques sont annoncées par rafales sur le marché en France et dans le monde. Récemment, l'immunothérapie spécifique a constitué la nouvelle vague d'innovation dans l'arsenal anticancéreux. Cette vague a commencée en 2011 avec l'arrivée de l'ipilimumab, un anticorps monoclonal contre le récepteur CTLA-4. Elle s'est poursuivie en 2015 avec le pembrolizumab et le et le nivolumab contre le récepteur PD-1, puis en 2017 avec l'arrivée de l'atézolizumab et l'avelumab sous ATU de cohorte contre le ligand du récepteur PD-1 (PD-L1) et tend à se prolonger de manière durable dans les années à venir.

De plus, selon un rapport de l'INCa [162] de nouvelles TC dans les pipelines vont enrichir l'arsenal thérapeutique de classes déjà existantes (anti-PARP, anti-PI3K, anti-ALK, anti-EGFR, anti-ckIT, anti-BRAF, anti-VEGFR). A cela s'ajoute, de nouvelles classes de TC, attendues dans les deux ans dans les cancers du sein (anti-CDK 4 et 6), du poumon (anti-phosphatidylserine), du colon-rectum(anti-IL-1 $\alpha$ ), dans les mélanomes (anti-IDO1, activateurs d'APC, agonistes de costimulation), et dans la LMC (anti-Bcl2, anti-Syk, anti-CD37).

Enfin de nombreuses extensions d'indications thérapeutiques de médicaments déjà autorisés sont attendues dans de nouvelles localisations tumorales, à de nouveaux stades de la maladie, à de nouvelles lignes de traitement, ou bien encore dans de nouvelles combinaisons.

Dans cette partie nous avons cherché à établir des prévisions à court-moyen terme sur la place de l'immunothérapie spécifique dans les années avenir afin de mieux cerner l'enthousiasme actuel qu'elle génère. Cependant, il convient de noter que ces prédictions sont loin d'être exhaustives du fait de la quantité d'informations considérables et de la rapidité d'évolution du sujet.



## 1. L'immunothérapie spécifique

L'immunothérapie spécifique se positionne aujourd'hui comme un acteur révolutionnaire dans certains types de cancers. Elle compte actuellement 5 spécialités (dont 1 en ATU de cohorte) inhibant 2 axes oncogéniques : B7/CTLA4 (réponse immunitaire précoce) et PD-1/PD-L1 (réponse immunitaire tardive) dans 7 indications cliniques (Tableau 15.)

Cible	Anti-CTLA4	Anti PD-1		Anti PD-L1	
Spécialités	Ipilimumab	Nivolumab	Pembrolizumab	Atézolizumab	Avélumab ATU
Indications	Mélanome avancé	Mélanome avancé	Mélanome avancé	Carcinome urothélial	Carcinome à cellules de Merkel métastatique
		CBNPC avancé	CBNPC avancé 1ère ligne TPS >50 %		
		Carcinome à cellules rénales avancé	CBNPC avancé 2ème ligneTPS=1 %		
		Lymphome de Hodgkin classique	Lymphome de Hodgkin classique	CBNPC avancé	
		Cancer épidermoïde de la tête et du cou	Carcinome urothélial		
		Carcinome urothélial			
Bibliographie	[163]	[164]	[165]	[166]	[167]

**TABLEAU 15. :** Les spécialités de l'immunothérapie spécifique disponible dans le traitement du cancer en 2017 et les indications de leurs AMM respectives.

Ces nouvelles spécialités constituent déjà une rupture dans le champ de l'oncologie du fait :

- De la stratégie de ciblage mise en place. Elles ne ciblent pas la cellule tumorale directement mais les voies d'inactivations du système immunitaire vis-à-vis de nombreuses types cellules tumorales. On parle d'inhibiteurs de check-points immunitaires. L'objectif est donc de rompre la tolérance de ce système immunitaire par rapport à la tumeur en bloquant un seul ou les deux axes oncogéniques simultanément.
- D'un spectre d'activité inégalé dans l'histoire des médicaments en cancérologie [168]. Plus de vingt cancers peuvent répondre à un traitement par anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1, et des bénéfices en survie globale ont été démontrés dans les essais randomisés de phase III dans plus de 6 indications.

- Des résultats révolutionnaires dans le traitement du mélanome métastatique (nivolumab +/- ipilimumab), dans le CBNPC métastatique en 1<sup>ère</sup> ligne, le cancer du rein, et dans le traitement des rechutes de leucémies lymphoblastiques B.

Cependant, il convient de préciser qu'elles ne s'adressent qu'à un certain sous-groupe de patients.

Concernant le traitement du mélanome métastatique notamment, le nivolumab a définitivement montré sa supériorité par rapport à la dacarbazine d'abord en situation de 1<sup>ère</sup> ligne puis par rapport à l'ipilimumab forte dose en situation adjuvante après résection complète de la tumeur aux stades IIIb/c ou IV :

- une SSP = 11,5 mois pour le bras nivolumab +i pilimumab vs. 2,9 mois pour ipilimumab
- un taux de survie à 5 ans record de 34% des patients traités [89]

De nouveaux agents anti PD-L1 vont très prochainement arriver sur le marché. Le durvalumab et l'avelumab déjà disponible dans le cadre d'une ATU de cohorte en France, ont obtenus le statut *breakthrough therapy* (révolutionnaire) par la FDA respectivement depuis février 2016 dans les cancers urothéliaux exprimant PD-L1 et en novembre 2015 dans le carcinome métastatique à cellules de Merkel. De plus le tremelimumab, un nouvel anti-CTLA-4 fait toujours l'objet d'essai clinique dans la cadre de combinaisons avec d'autres agents anti PD-1, anti PDL-1 malgré l'échec récent de son évaluation sur sa supériorité sur la chimiothérapie dans le CBNPC avancé en 1<sup>ère</sup> ligne. [169]

Mais c'est surtout l'exploration de leur efficacité au niveau de diverses identités biologiques, stades et localisations tumorales qui fait l'objet de la plupart des essais cliniques en cours, au travers de nombreux schémas thérapeutiques (associations, premières lignes, situations adjuvantes et néoadjuvantes, notamment). C'est ce que nous avons essayé d'évaluer ci-dessous en mettant à jour un travail déjà effectuer par l'INCa il y a quelques années [162].

Les essais cliniques de phase III enregistrés sur le site internet *clinicaltrials.gov* américain à partir de Janvier 2017 permettent de donner un aperçu des nouvelles indications et des schémas thérapeutiques des molécules anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 à venir pour les périodes allant de 2018 à l'horizon 2025 [170].

Pour ce faire, nous avons utilisé l'outil de recherche avancée (*Advanced Search*) de la base de données *clinicaltrials.gov* en utilisant les paramètres de recherche suivant :

- Dans la cellule *Condition / Disease* : « Cancer »
- Dans la cellule *Other Terms* : « immunologic », puis « immunotherapy » puis « PD-1 » puis, « PD-L1 », puis « CTLA-4 » successivement (5 recherches).
- Dans la cellule *Country* : aucune entrée
- Dans la cellule *First Posted* : *From* « 01/01/2017 » *To* aucune entrée
- Puis nous avons coché les filtres : *Recruiting* ; *Not yet recruiting* ; *Active not recruiting* ; *Interventional* ; *Adult (18–65)* ; *Senior (66+)* ; *Phase 3*

Pour chaque entrée de la cellule *Other Terms*, nous avons enregistré les résultats, puis réinitialisé la recherche. (Figure 12)

The screenshot shows the 'Advanced Search' form on the clinicaltrials.gov website. The search criteria are as follows:

- Condition / Disease:** Cancer
- Other Terms:** immunologic
- Country:** (empty)
- First Posted:** From 01/01/2017 To (empty)

The filters applied are:

- ☒ Recruiting
- ☒ Not yet recruiting
- ☒ Active not recruiting
- ☒ Interventional
- ☒ Adult (18–65)
- ☒ Senior (66+)
- ☒ Phase 3

The result count is 126 Studies found for.

**FIGURE 12 :** Paramètres de recherche sur la base de données *clinicaltrials.gov*

Nous avons obtenu 131 essais cliniques de phase III. Puis nous avons supprimé les études qui n'avaient pas de lien direct avec l'immunothérapie spécifique et les doublons, pour obtenir un total de 61 essais cliniques. Nous avons retenu 3 paramètres : la localisation de la tumeur, la place des TC dans le traitement (1<sup>ère</sup> vs. 2<sup>ème</sup> ligne ou plus), la date prévue de la fin de l'essai clinique et le nom de quelques spécialités. Sans être exhaustive, ni irréprochable, cette recherche donne les grandes lignes des futurs enjeux des agents immuno- oncologiques.

### **Résultats** : (Tableau 16)

Notons d'abord le nombre important de combinaisons avec des agents de différentes classes : des cytotoxiques (étoposide, sels de platines, paclitaxel principalement dans le CBNPC), d'autres immunothérapies qui sont la plupart du temps des agents anti-CTLA-4, des antihormonaux dans le cancer de la prostate, des ITK ainsi qu'à la radiothérapie.

Le durvalumab est fréquemment positionné en association au tremilimumab dans son développement clinique et l'ipilimumab avec l'atézolizumab. Par ailleurs l'association avec l'epacadostrat intervient dans 7 essais cliniques. Cette molécule se définit comme un immuno-régulateur, en inhibant l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1) une enzyme du métabolisme du tryptophane qui module la réponse immunitaire antitumorale en stimulant la génération des cellules T régulatrices et en bloquant l'activation des cellules T effectrices, permettant ainsi la croissance tumorale.

Parmi les nouvelles molécules qui pourrions potentiellement arriver sur le marché on compte 6 agents anti PD-1 en monothérapie (le IBI308, BCD-100, BCD-100, REGN 2810, SHR-1210 et le BGB-A31. Seul le SHR-1210 est évalué en combinaison avec le pemetrexed dans le cadre du traitement du CBNPC.

Le tableau ci-dessous présente un bilan des 61 essais cliniques de phases 3 évaluant au moins un anti-PD-1, anti-PD-L1 et/ou un anti-CTLA-4 dont la date de fin d'essai programmée est prévue entre 2018 et 2025.

Les 61 phases III concernent 14 localités tumorales différentes aussi bien en 1<sup>ère</sup> ligne qu'en 2<sup>ème</sup> et dans certains cas en situation adjuvante/néoadjuvante. D'après ce tableau, nous pouvons remarquer que l'immunothérapie spécifique est massivement investie dans le traitement du CBNPC avec de possibles nouvelles recommandations tous les ans pour tous les stades de la maladie avec un pic vers 2021-2022. Sur les 61 essais cliniques recensés, 20 concernent la localisation du poumon toute lignes thérapeutiques confondues : 18 pour le CBNPC, 2 pour le cancer du poumon à petite cellules. Concernant ce dernier, l'immunothérapie spécifique entend s'intégrer directement en 1<sup>ère</sup> ligne, ce qui peut être une avancée décisive lorsque l'on sait qu'aucune TC existe dans cette indication. Pour le CBNPC, il

s'agira probablement de la confirmation des indications des anti PDL-1 dont le durvalumab et l'optimisation de combinaisons thérapeutiques synergiques avec les anti PD-1.

L'immunologie spécifique fait également pleinement part des innovations dans le cancer de la tête et du cou (+/- associé au cetuximab), dans le mRCC et dans le cancer gastrique.

Notons également l'espoir que représente l'immunothérapie spécifique dans le cancer du sein triples négatifs essentiellement en position adjuvante et néoadjuvante. A l'instar du cancer du poumon à petite cellule, c'est un cancer au pronostique très sombre et où les agents immuno-oncologiques peuvent transformer l'histoire de la maladie et il est possible de voir arriver des essais cliniques de grande envergure pour cette indication allant jusqu'en 2025.

Pour la plupart des localisations, l'immunothérapie spécifique s'investit en 1<sup>ère</sup> ligne, ce qui promet quelques bouleversements dans la prise en charge de certains cancers.

Ces essais cliniques de phase III font partis des 280 essais cliniques recensés en immuno-oncologie en 2017 selon l'association de la recherche biopharmaceutique américaine (PhRMA), témoignant des efforts considérables investis dans cette stratégie. [89]

Concernant cette recherche, il convient de préciser qu'elle ne prend pas compte les essais cliniques de phase III enregistrés dans la base donnée avant le 1<sup>er</sup> janvier 2017. D'autre part, les mots clés utilisés aurait pu être davantage enrichi pour effectuer la recherche, tel que « neoplastic » à la place de « cancer », ainsi que « immunoglobulin » « lymphocyte » « cluster differentiation receptor » etc. De ce fait, cette recherche n'est pas exhaustive.

Date de fin d'essai programmé	Localisations	Stratégie thérapeutique	Nombre d'essais cliniques n
2018	CBNPC	1ère ligne	1
	Mélanome	1ère ligne	1
	Carcinome Hepato-Cell	2ème ligne ou >	1
2019	Vessie	1ère ligne	1
	Sein Triple Négatifs	Adjuvant	1
	CBNPC	2ème ligne ou >	1
2020	CBNPC	1ère et 2ème ligne	1
	Gastrique	2ème ligne ou >	1
2021	Sein Triple Négatifs	Neoadjuvant	1
	Sein Triple Négatifs	1ère ligne	2
	Ovaires	1ère ligne	2
	CBNPC	1ère ligne	5
	CBNPC	2ème ligne ou >	3
	Tête et cou	1ère ligne	1
	Tête et cou	2ème ligne ou >	1
	Poumon à petite cellule	1ère ligne	1
	Mesothelium	2ème ligne ou >	1
	Rein	Adjuvant	1
	Prostate	2ème ligne ou >	1
	Vessie	2ème ligne ou >	1
2022	CBNPC	1ère ligne	2
	CBNPC	2ème ligne ou >	4
	Poumon à petite cellule	1ère ligne	1
	Prostate	2ème ligne ou >	1
	Tumeurs solides	1ère ligne	1
	Rein	Adjuvant	1
	Gastrique	1ère ligne	1
	Tête et cou	2ème ligne ou >	1
	Vessie	1ère ligne	1
2023	Gastrique	2ème ligne ou >	1
	Tête et cou	2ème ligne ou >	3
	Tête et cou	1ère ligne	1
	Rein	2ème ligne ou >	2
	Mélanome	Adjuvant	1
	Gastrique	1ère ligne	1
	Mésothelium	2ème ligne ou >	1
	Rein	1ère ligne	1
2024	Rein	2ème ligne ou >	2
	Sein Triple Négatifs	Néoadjuvant	1
	CBNPC	1ère ligne	1
	Lymphome de Hodgkin	2ème ligne ou >	1
	Mélanome	Adjuvant	1
	Lymphome Non-Hodgkinien	2ème ligne ou >	1
2025	Carcinome Hepato-Cell	1ère ligne	1
	Sein Triple Négatifs	Néoadjuvant	1
<b>Total</b>	<b>61</b>		

**TABLEAU 16 :** Bilan des essais cliniques de phase III des agents de l'immunothérapie spécifiques enregistrés à partir du 1er janvier 2017 sur la base *clinicaltrials.org*

## 2. Les CAR-T

Les CART-T (*chimeric antigen receptor T*) sont à la croisée entre l'immunothérapie et la thérapie génique. Ce sont des lymphocytes T (LT) génétiquement modifiés et préparés *in vitro* pour reconnaître spécifiquement certains clones tumoraux et les attaquer ultérieurement (par activation du système immunitaire) une fois réinjectés au donneur malade. (Figure 13)

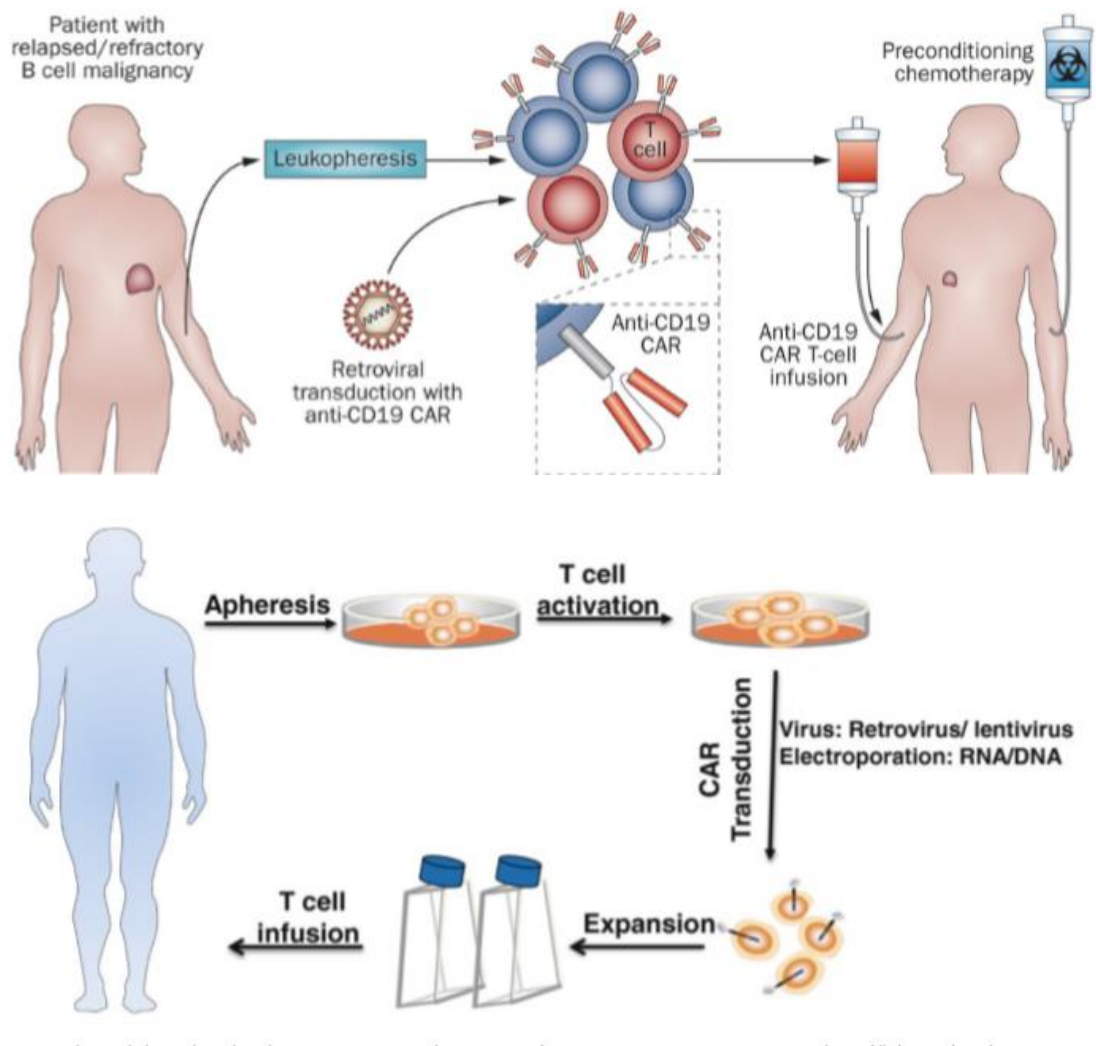


FIGURE 13 : Schéma simplifié de l'emploi des CAR-T [160]

Leur processus de fabrication s'organise en 5 étapes pour une durée moyenne de 22 jours. il repose sur la vectorisation du gène codant pour le récepteur d'antigène chimérique (CAR) dans les lymphocytes T du donneur.

En août 2017, la FDA autorise la mise sur le marché du tisagenlecleucel (Kymriah indiqué chez les patients atteints de leucémie lymphoïde aiguë à cellules B en situation d'échec thérapeutique ou de rechute. Ici, les LT sont conçues pour cibler la protéine CD19 surexprimée sur les cellules clonales B. Ce traitement est rapporté comme révolutionnaire en raison de son efficacité remarquable à long terme et en une seule administration. Les résultats de l'étude pivot multicentrique ont rapporté un taux de rémission complète 83 % [160]. Mais il est toutefois associé à des événements secondaires graves, potentiellement mortels parmi lesquelles on compte le syndrome de relargage des cytokines et les toxicités neurologiques qui ont touché près de la moitié des patients dans l'essai pivot. [160]

Ce genre de traitement semble en effet avoir des possibilités infinies, qui vont bien au-delà des hémopathies malignes car il serait susceptible d'interagir avec n'importe quelles structures extracellulaires et de développer une réaction immunitaire contre elles.



## PARTIE II : LA RÉPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN (DNA DAMAGE REPOSSE)

L'ADN constitue le support de la totalité de l'information génétique d'un individu. De ce fait le maintien de son intégrité pour la conservation et la transmission de cette information est à la base de la survie de tous les organismes vivants. Pourtant, cette molécule d'ADN est perpétuellement soumise à des dommages de diverses natures. La capacité d'une cellule à réparer son ADN est alors cruciale. Si les lésions sont laissées tel quel, les conséquences peuvent être graves à la fois pour le porteur et sa descendance. En réponse aux facteurs endommageant son ADN, les cellules eucaryotes ont développé une réponse garantissant la stabilité du génome dans le but de survivre aux conditions défavorables et transmettre l'information génétique intacte aux générations suivantes. Cette réponse porte le nom de Réponse aux Dommages de l'ADN ou DNA Damage Response (DDR) en anglais. Ce phénomène fait l'objet de cette seconde partie.

## A. NATURE ET ORIGINES DES DOMMAGES DE L'ADN

L'ADN de chaque cellule d'un individu subi entre 1000 et 10 000 lésions par jour [173]. On regroupe les facteurs à l'origine de ces lésions en deux groupes en fonction de leur origine :

- Les facteurs endogènes
- Les facteurs exogènes

### 1. Les facteurs endogènes

Le métabolisme cellulaire normal est à l'origine de très nombreux dommages sur l'ADN. C'est un point fondamental sur lequel repose le reste de notre étude. De manière générale, les facteurs endogènes sont soit de natures chimiques inhérents à tous type de molécules complexes, soit issus des processus biologiques.

## a. Processus chimiques

Parmi les facteurs d'origine chimiques, on compte l'hydrolyse spontanée des bases azotées de l'ADN qui se manifeste par la dépurination ou la dépyrimidination (hydrolyse entre le pentose et la base azotée) et la désamination oxydative (conversion de cytosine en uracile, adénine en hypoxanthine, etc.). On compte également les espèces réactives à l'oxygène appelé ROS (*Reactive oxygen species* en anglais) issues du métabolisme oxydatif, qui sont produits en continu par la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie. Au contact de l'ADN ces ROS vont former des adduits résultants de l'addition de groupements chimiques oxygénés très réactifs sur un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente.

## b. Processus biologiques

Le métabolisme cellulaire normale est une source de dommages perpétuelle pour la molécule d'ADN. La majorité de ces lésions proviennent des erreurs commises par l'ADN polymérase au cours de la réplication induisant des mésappariements de bases. Ils peuvent survenir également lors de déroulement de l'ADN par l'hélicase ou de la ségrégation des chromosomes pendant la mitose

Certains dommages sont spécifiques de régions de l'ADN :

- C'est le cas des télomères. Grâce à la télomérase, le maintien de leur nombre est assuré. Cependant le maintien est incomplet et au cours des divisions cellulaires successives, il y a une diminution progressive du nombre ( $\approx 100$  paires de bases à chaque division). Cette érosion progressive des séquences fait que les télomères atteignent une taille critique (ou seuil). Il y a alors arrêt de la croissance, suivi d'une sénescence cellulaire. Au-delà d'une taille critique, cela crée une instabilité génomique et donc une lésion de l'ADN [174].
- C'est également le cas des microsatellites, des séquences de nucléotides répétées en tandem de 4 à 100 fois ou plus. Ces séquences sont favorables à l'accumulation de mutations car les ADN polymérases ne se lient pas efficacement à l'ADN en synthèse. Ceci entraîne la formation de boucles extra hélicoïdales et des mésappariements qui

engendre, selon les cas, une augmentation ou une diminution du nombre de microsatellites, qui induit une instabilité génomique [175].

D'autres types de dommages endogènes sont spécifiques d'un type cellulaire. C'est le cas des délétions et des translocations qui surviennent lors de la création du répertoire des récepteurs T et B des lymphocytes. [176]

## 2. Les facteurs exogènes

L'environnement soumet en permanence l'ADN à différentes agressions. Celles-ci sont répertoriées en fonction de leur origine qu'elle soit physique, chimique ou issu d'agents pathogènes.

### a. Facteurs physiques

Le rayonnement ultraviolet du Soleil constitue l'essentiel des agressions physiques de l'ADN via un double mécanisme. Ce rayonnement se définit par un transfert d'énergie ionisant qui ira soit directement altérer la molécule d'ADN, soit casser des molécules d'eau très abondantes et former des radicaux libres très réactifs qui vont ultérieurement léser l'ADN. Les conséquences biologiques vont varier en fonction de la fréquence du rayonnement et de la durée d'exposition. [177]

### b. Facteurs chimiques

Parmi ces agents on distingue ceux qui ont une action directe sur l'ADN et ceux qui deviennent génotoxiques après une activation de l'organisme. On parle alors de bioactivation métabolique. C'est le cas du Lindane, un pesticide organochloré utilisé pour de nombreuses applications agricoles, le traitement du bois ainsi qu'en médecine vétérinaire et humaine [178]. D'autres agents qui n'ont aucune activité génotoxique seuls révèlent une activité génotoxique lorsqu'ils sont mélangés à d'autres agents. C'est le cas du procymidone mélangé à 4 autres pesticides fongicides. C'est un phénomène appelé « effet cocktail » qui décrit un

phénomène synergique des propriétés toxiques de ces agents [179]. Les mécanismes lésionnels de ces agents chimiques sont très nombreux. Au niveau de l'ADN ils peuvent être alkylant, intercalant, pontant, oxydant, etc. Mais leur effet peut atteindre la structure des chromosomes à l'origine de fusions, cassures, de mauvaises ségrégations pendant la mitose ou de non disjonction pendant la mitose. [178 ,179]

En France, ils sont répertoriés par l'ANSES et font partie des agents regroupés sous l'acronyme « CMR » pour Cancérogènes, Mutagènes Reprotoxiques. En 2016, la liste principale regroupait 1147 agents et la liste des agents dérivés du charbon et du pétrole comptait 671 agents. [180] Les plus célèbres d'entre eux sont le tabac dont la combustion produit du benzo(a)pyrene qui réagit avec la guanine pour former un adduit mais également l'aflatoxine, une mycotoxine que l'on rencontre très souvent dans de nombreuses denrées alimentaires et qui s'intercale entre les bases.

### c. Agents pathogènes

Outre les génotoxiques physiques ou chimiques mettant en péril l'intégrité génomique, les agents pathogènes peuvent être à l'origine de dommages à l'ADN et ou d'une dérégulation du DDR. Ils peuvent être soit la conséquence directe de l'action de protéines virales, bactériennes ou parasitaires soit être la résultante de la réplication des parasites ou de la réaction cellulaire inflammatoire induite par l'infection [181].

Plusieurs études ont démontré que des toxines bactériennes sont capables d'altérer le génome de la cellule hôte en produisant des cassures et des modifications de l'ADN ainsi que d'interagir avec les acteurs du DDR. La caractérisation de l'îlot génomique « pks » présent dans les souches d'*Escherichia Coli* pathogènes a permis d'identifier une génotoxine, la colibactine, capable d'induire de multiples cassures dans l'ADN [182]. L'îlot pks a depuis été retrouvé chez plusieurs entérobactéries dont *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* et serait également à l'origine du même type de dommages dans les cellules infectées par ces bactéries.

Les infections virales constituent également une agression majeure pour la cellule hôte. Du fait de l'intégration du matériel génétique virale dans la cellule hôte, l'activation de la DDR

peut s'avérer être dans certains cas une réponse cellulaire antivirale efficace. En effet, rapidement après l'infection, les génomes viraux peuvent être reconnus par la cellule comme de l'ADN endommagé conduisant à l'activation de la DDR et à l'arrêt prolifératif des cellules infectées voire à la mort de celles-ci et de ce fait à l'élimination du virus. Par exemple, les virus de la famille Herpes peuvent entrer dans une phase de la latence ou leur matériel génétique subit une répression de leur expression par des mécanismes épigénétiques (histones hyper-méthylés et hypo-acétylés) permettant au virus d'échapper aux sondes du DDR et ainsi de persister dans la cellule hôte. [185].

### 3. Les dommages de l'ADN

Les différents dommages induits par l'ensemble des facteurs détaillés au-dessus peuvent être classer en deux grands types :

- Les modifications de la structure d'ADN
- Les cassures d'ADN
- 

#### a. Les modifications de la structure de l'ADN [186].

La formation d'adduits par fixation covalentes de groupements hautement réactifs sur l'ADN va secondairement détériorer la structure de la double hélice. Selon la nature chimique du groupement, les dommages peuvent être variables :

- L'oxydation des bases si les groupements sont par exemple des ROS
- La formation de pontages intra et inter-brins ou de type ADN-protéines si les groupements sont des agents alkylants tels que les moutardes azotées ou les sels de platine.
- Dans les 2 cas, il y a des mésappariements, par perte de la liaison d'hydrogène formée entre les bases complémentaires assurant la cohésion de l'hélice d'ADN.

Par ailleurs, des dimères de pyrimidines peuvent se former. Il s'agit d'une liaison covalente entre 2 pyrimidines adjacentes au détriment de la liaison d'hydrogène habituellement formée entre les bases complémentaires secondaire à une déstabilisation du noyau aromatique. Ces

pontages intramoléculaires perturbent la conformation stérique de l'ADN et inhibe la progression de la machinerie de réplication cellulaire.

Un excès d'énergie thermique peut conduire à la désamination des bases azotées et conduire à la formation d'hypoxanthines, de xanthines et d'uraciles au sein de la molécule d'ADN conduisant à un mésappariement de type « U:G » qui après réplication de l'ADN conduit à une mutation par transition « C:T ».

Enfin des réactions de dépurinations et de dépyrimidinations peuvent se produire spontanément à pH acide sur l'ADN par rupture de la liaison  $\beta$ -N-glycosidique conduisant à un site abasique ou site AP.

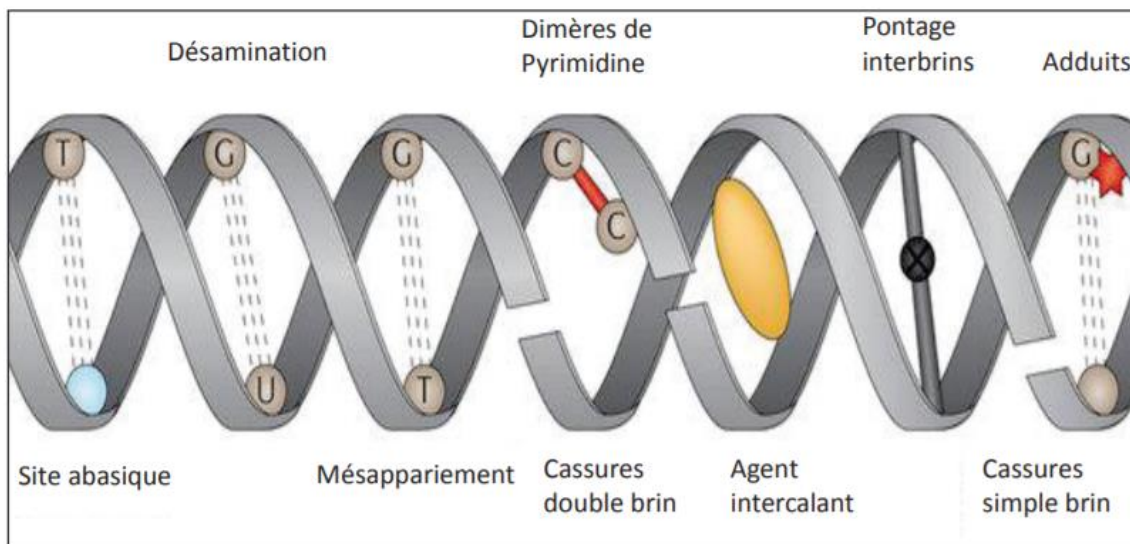
L'ensemble de ces dommages peut conduire secondairement à des cassures simple brin.

#### **b. Les cassures d'ADN [187].**

Les cassures simple brin (CSB) sont très fréquentes dans les cellules. L'apparition spontanée de CSB est estimée entre 3 à  $10^4$  lésions par cellule et par jour. Les ROS issus du stress oxydatif sont une des sources majeures d'inductions de CSB, dont le plus répandu est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Elles sont, en situation normale, très bien prise en charge par les systèmes de réparations simple brin. En revanche si elles persistent après que l'ADN polymérases n'ait effectué la réplication, elles affectent la stabilité génétique et la survie cellulaire, du fait de la formation de cassures double brin (CDB) au niveau de la fourche de réplication.

L'apparition de CDB dans une cellule est rare (2 à 8 cassures spontanées par cellule/jour). Néanmoins, ces dommages sont les plus délétères pour la cellule. De ce fait, leur surveillance et leur réparation sont primordiales. Les CDB peuvent être induites spontanément lors de la réplication de l'ADN, notamment lorsque la fourche de réplication se bloque par la présence de lésions sur l'ADN (bases modifiées ou sites abasiques, adduits, pontages, liaisons covalentes avec des protéines, cassures) ou par la présence de structures particulières de l'ADN (hybrides ARN/ADN, complexe de transcription, etc). L'impossibilité pour la fourche de réplication de progresser peut alors introduire des ruptures internes de l'hélice d'ADN.

Il existe également des CDB physiologiques générées par exemple par les topoisomérases de type II (Topo II) pour permettre la relaxation de la double-hélice d'ADN, permettant ultérieurement la transcription ou la réplication. [188]. Certains agents anticancéreux utilisent cette cassure physiologique. C'est le cas de l'étoposide qui bloque le complexe ADN/Topo II en établissant des liaisons covalentes avec l'ADN et forme un complexe ternaire empêchant la religation. Les radiations ionisantes, peuvent également générer des CDB de manière directe ou indirecte comme il a été décrit au-dessus. La figure 14 résume les types de dommages que l'ADN peut subir.



**FIGURE 14** : Exemples des différents types de dommages à l'ADN [187].



## B. ORGANISATION DE LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN (DDR)

En réponse aux facteurs endommageant son ADN, les cellules eucaryotes ont développé un système d'intégration de différents processus cellulaires très efficace qui coordonne à la fois la réplication, le système de réparation pour détecter et réparer les lésions, la progression du cycle cellulaire, la modulation du métabolisme cellulaire et dans certains cas la mort cellulaire programmée. Ce réseau de signalisation coordonné porte le nom de Réponse aux Dommages de l'ADN ou DNA Damage Response (DDR) en anglais. La description de ce phénomène a valu à trois chercheurs Tomas Lindahl, Paul Modrich et Aziz Sancar le prix Nobel de chimie en 2015. Ils ont déclaré : « *...au rythme auquel l'ADN se dégrade, la vie sur Terre telle que nous la connaissons ne pourrait pas exister et donc qu'il devait exister des systèmes de réparation de l'ADN...* » [189]

### 1. Mécanismes généraux

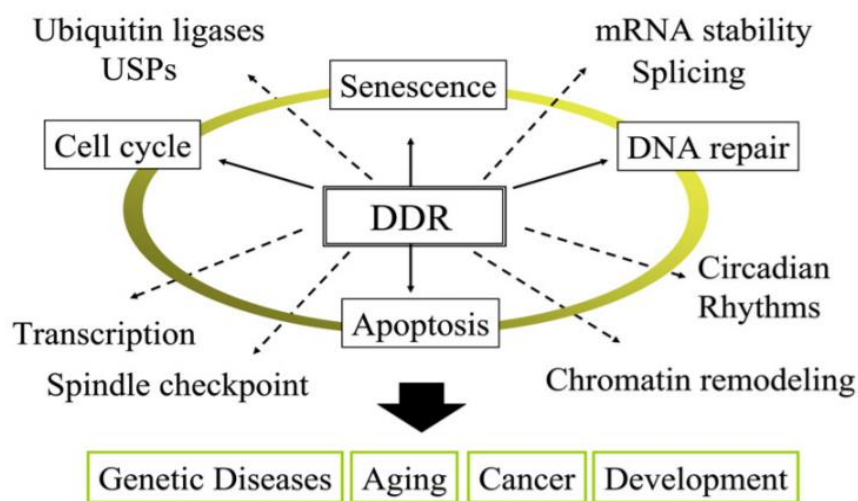
L'objectif principale de la DDR repose sur la détection des lésions de l'ADN, en régulant la progression du cycle cellulaire via l'activation des checkpoints, puis arrêter la réplication afin de déclencher les mécanismes de réparation de l'ADN appropriés, ou éliminer la cellule atteinte lorsque les dégâts sur le génome sont irréparables [190]. Du fait de son importance cruciale, ce système de réparation de l'ADN et de coordination des voies de signalisations a été hautement conservé au cours de l'évolution. L'influence fondamentale de ce système pour le développement et la survie des individus est illustrée par la grande variété de maladies et les syndromes prédisposant au cancer qui sont liées aux mutations de gènes DDR [191]. La dernière décennie a fait l'objet de progrès considérables dans la découverte des acteurs clés et des processus cellulaires dans le réseau de signalisation engageant la DDR.

Les découvertes ont d'abord porté sur les différents acteurs (MCM, TopBP1, etc.) qui contrôlent la vitesse de la réplication en réponse aux dommages de l'ADN. [192]. D'autres études ont révélé la manière dont les différentes voies de réparation de l'ADN sont intégrées

dans la DDR et leurs couplages avec les polymérases et le métabolisme des nucléotides et la régulation du cycle cellulaire. [193].

Mais les découvertes les plus surprenantes concernent le grand nombre de processus cellulaires connectés au réseau de la DDR. On compte parmi eux, la voie de signalisation de l'insuline, l'épissage de l'ARN, la dégradation des ARNm non-sens (contrôle qualité des ARNm comportant un codon-stop), le checkpoint du fuseau mitotique, des protéines kinétochores au niveau des régions centromériques des chromosomes mitotiques, des protéines suppresseurs de tumeurs ou encore des protéines modulant le remodelage de la chromatine. Il a même été démontrés plusieurs connexions de la DDR et le métabolisme circadien [194]. (Figure 15)

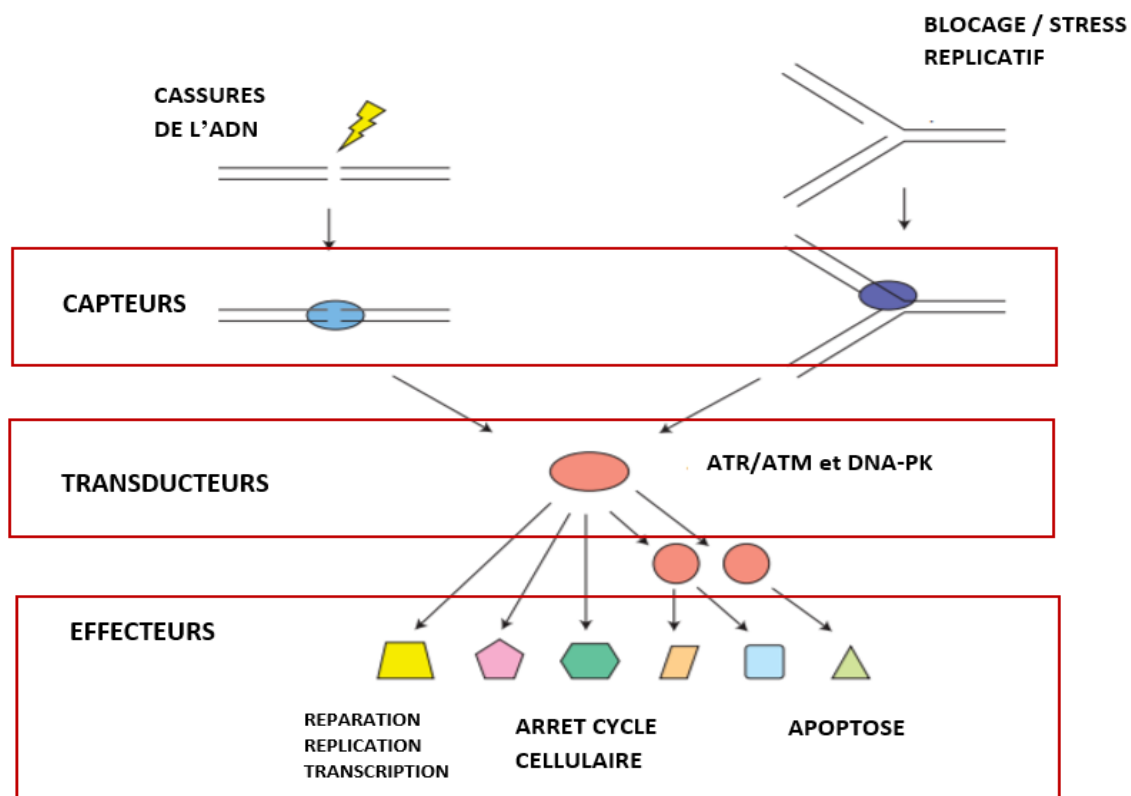
Ces découvertes témoignent du rôle beaucoup plus vaste de la DDR en physiologie cellulaire que ce que l'on croyait il y a dix ans.



**FIGURE 15** L'intégration des processus cellulaires coordonnés par la DDR [195]

La DDR s'organise comme un réseau de voies de signalisations classiques, avec trois types d'acteurs (Figure 16) :

- Des capteurs du signal
- Des transducteurs du message
- Des effecteurs



**FIGURE 16** : Organisation de la DDR

Contrairement à la transduction d'un signal biochimique classique initié par le ligand d'un récepteur à activité kinase, les voies de signalisations de la DDR sont activées soit par des structures aberrantes de l'ADN, soit par un blocage de la fourchette de réplication au cours d'un stress réplcatif. Les capteurs de ces deux stimulus vont initier les cascades réactionnelles de la DDR. Les transducteurs sont des kinases qui vont amplifier et communiquer le signal à tous les effecteurs. Les effecteurs, qui sont les substrats de ces kinases, sont impliqués dans

un large spectre de processus cellulaires fondamentaux pour la maintenance et la stabilité du génome.

Chez les eucaryotes, la transduction du signal à l'origine des cascades réactionnelles de la DDR est effectuée par 3 acteurs clés qui constituent le carrefour métabolique dans la signalisation des différents processus effecteurs :

- La protéine ATM (*Ataxia-Telangiectasia Muted*) impliquée dans la réponse aux CDB de l'ADN et aux perturbations de la structure de la chromatine. Il a pour effecteur la protéine kinase Chk2, checkpoint entre les phases G1 et S. [196, 198]
- La protéine ATR (*Ataxia-Telangiectasia Muted- rad3-Related*) impliqué dans la réponse à une large gamme de dommages de l'ADN et plus spécifiquement aux stress réplicatifs. Il a pour effecteur la protéine kinase Chk1, checkpoint entre les phases G2 et M. [197, 198]
- Le complexe DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) régule un plus petit nombre de cibles et il est impliqué dans la réponse aux CDB de l'ADN en déclenchant la voie de réparation des jonctions des extrémités non homologues (NHEJ) que nous développerons ultérieurement. [198]

## 2. Les transducteurs centraux ATR – ATM – DNA-PK

ATM et ATR sont les transducteurs centraux de la réponse aux dommages de l'ADN alors que le rôle de DNA-PK est plus restreint. L'ensemble des processus cellulaires mis en place dans cette réponse sont soit DNA-PK-, ATR- ou ATM-dépendant.

Ces trois protéines sont des sérine / thréonine kinases, membres de la famille des phosphatidylinositol-3- like kinase (PIKKs) [199]. Elles partagent une organisation structurale commune avec un domaine kinase PIKK en carboxy-terminale comportant le domaine de régulation FAT (FRAP-ATM-TRRAP) et une répétition de séquence d'hélicoïdale HEAT (*Huntington-elongation factor 3-protein phosphatase 2A-TOR1*) en amino-terminale. En

situation normale, le domaine FAT et le domaine kinase interagissent ce qui inhibe leur activité. Cependant en cas de dommage de l'ADN, l'interaction entre FAT et le domaine kinase est perturbé par un mécanisme autophosphorylation ce qui actionne l'activité kinase. [200]. Seul le DNA-PK est sous forme d'un complexe hétérotrimérique composé de deux sous-unités Ku et d'une sous-unité DNA-PKcs.

Nous décrirons chacune à leur tour les phénomènes faisant suite à leur activation.

#### a. La voie ATM

Les CDB sont l'une des formes les plus délétères des dommages de l'ADN. C'est dans le cadre de ces lésions que la protéine ATM opère.

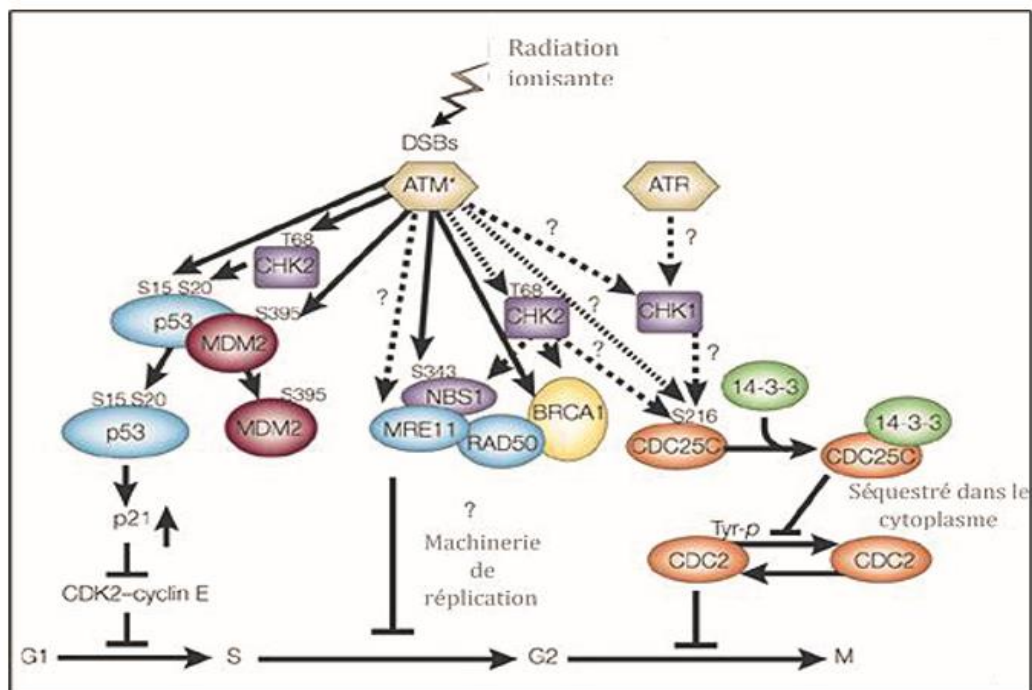
**Les capteurs** : L'apparition de CDB va rapidement induire l'assemblage d'un complexe récepteur MRN constitué des protéines Mre11-RAD50-Nbs1 au niveau du site de cassures de l'ADN. Ce complexe « récepteur » va d'une part assurer la détection des CDB et d'autre part permettre de conserver un rapprochement des extrémités d'ADN lésées. Le complexe MRN va ensuite recruter la kinase ATM au site des CDB via Nbs-1 [201]. À l'état inactif, ATM est sous la forme d'homodimères. Les extrémités émoussées des simples brins d'ADN à la suite de leurs cassures associées au complexe MRN va activer ATM par autophosphorylation intermoléculaire de la sérine 1981 (domaine FAT), libérant des monomères actifs présentant une activité kinase. [200].

Immédiatement après son activation, ATM phosphoryle le variant H2AX de l'histone H2A sur la sérine 139 (nommée alors  $\gamma$ H2AX) qui se déplace de part et d'autre des CDB. C'est un évènement clé du processus activateur des effecteurs d'ATM.

$\gamma$ H2AX va recruter la protéine Mdc1. Ceci a pour effet la formation de foyers  $\gamma$ H2AX-Mdc1 sur les foci de part et d'autre de la cassure. Mdc1 a le pouvoir de recruter la protéine ATM. Ainsi la capacité de Mdc1 à lier à la fois  $\gamma$ H2AX et ATM fournit un mécanisme amplificateur de reconnaissance l'ATM sur la chromatine encadrant les CDB. Plus de protéines ATM recrutées va entraîner plus de phosphorylation de l'histone H2AX. Il en suit une boucle d'alimentation amplificateur qui propage ATM et les foyers  $\gamma$ H2AX-Mdc1 sur de large pan de chromatine.

**Les effecteurs** : Les premiers effecteurs de la collection de protéines ATM concernent les acteurs de la régulation du cycle cellulaire Chk2 (Checkpoint) et la protéine suppresseur de tumeur p53 [202]. ATM va phosphoryler Chk2 qui joue un rôle dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire G1/S. ATM va parallèlement phosphoryler p53, produisant le blocage du cycle. p53 phosphorylé induit l'expression du régulateur du cycle cellulaire p21<sup>Cip1</sup> qui est responsable de l'inhibition de la cycline E et des kinases cycline-dépendante cdk2 qui lui sont associées, empêchant ainsi la progression du cycle vers la phase S [203].

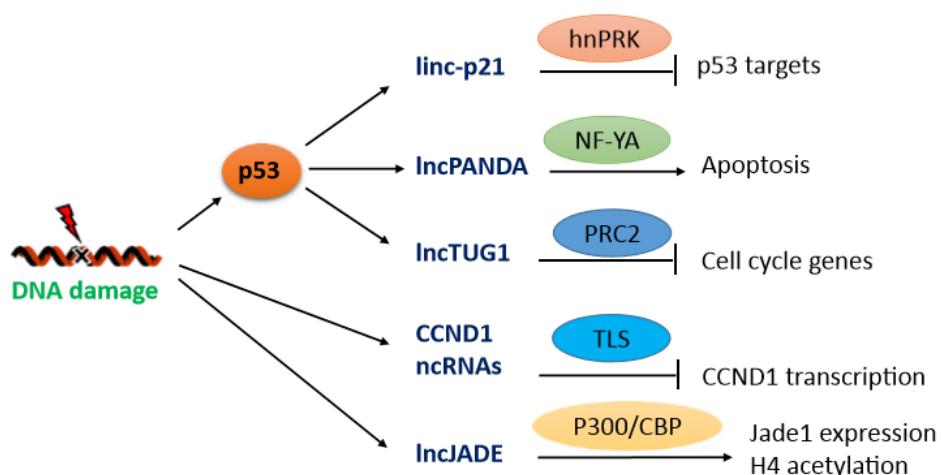
La voie ATM peut activer le checkpoint intra-phase S via le recrutement de BRCA1 par le complexe MRN. ATM peut également conduire à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire en G2/M par ubiquitinylation puis la dégradation de la phosphatase Cdc25A. Ceci maintient Chk2 phosphorylé ce qui entraîne l'inactivation de la kinase cdc-2 (cell division cycle protein 2) du fait de groupements phosphates inhibiteurs, empêchant ainsi la progression du cycle cellulaire et l'entrée en mitose [204]. Ces arrêts du cycle cellulaire sont une étape transitoire mais essentielle afin d'éviter la réplication d'ADN endommagé. (Figure 17)



**FIGURE 17** : La voie ATM [200]

**La régulation** : La voie ATM est principalement régulée par des modifications post-traductionnelles des différentes protéines impliquées dans la signalisation parmi lesquelles on compte la phosphorylation/déphosphorylation, l'ubiquitination/déubiquitination, la sumoylation/désomoylation. Mais de récentes études [205,206] ont révélées un mécanisme de régulation de la voie ATM par une série d'ARN non-codants parmi lesquelles on compte :

- Des miARNs (microARNs) qui exécutent une régulation négative de l'expression des acteurs biochimiques H2AX, p53, Cdk2 et Cdc25a et ATM lui-même par fixation sur leurs ARN messagers (ARNm).
- Des lncARNs (long non-coding ARNs) qui exercent une activité épigénétique sur les gènes cibles. Mais à la différence des miARNs, les lncARNs sont impliqués dans une large gamme de processus de la réparation de l'ADN essentiellement régulés par la protéine p53. Par exemple, lorsque l'atteinte du génome des cellules immunitaires est trop importante p53 va activer l'expression de PANDA lncARN qui associée à NF-YA, forme un complexe pro-apoptotique. Un autre exemple est celui du JADE lncARN, dont l'activation, ATM-dépendante est un acteur clé de l'acétylation des histones H4 après la détection des dommages de l'ADN. (Figure 18.) [207]



**FIGURE 18** : Régulation de la voie ATM [207]

L'expression des lncRNAs est globalement régulée par p53 ou par des facteurs de transcription activés par la lésion de l'ADN. Ces lncRNA, une fois activés, participent à la DDR en modulant l'expression des gènes en aval.

La voie ATM est activement impliquée dans la méiose dont sont issues les gamètes. [208] Elle est aussi importante au niveau du système immunitaire car elle répare les CDB survenant lors de la recombinaison V(D)J des récepteurs lymphocytes B et T immatures qui permet de produire un clone lymphocytaire unique [176,209]

La voie ATM joue un rôle crucial dans le contrôle et la suppression de l'instabilité génomique. L'importance de la voie ATM est particulièrement illustrée par des maladies génétiques associées à des mutations affectant le gène ATM responsable de la maladie neurodégénérative de l'ataxie-télangiectasie (AT) [210], des mutations du gène codant la protéine Nbs1 du complexe MRN conduisant à l'apparition du syndrome des cassures de Nijmegen ou des mutations de Chk2 impliquées dans le développement de la maladie de Li-Fraumeni [211]. Ces pathologies héréditaires sont généralement caractérisées par une déficience immunitaire et une prédisposition au développement de divers cancers du fait de l'instabilité chromosomique générée à la suite des dommages de l'ADN.

## **b. La voie ATR**

Contrairement à ATM, la protéine ATR est fondamentale pour la survie et la prolifération cellulaire du fait de son rôle cruciale dans la surveillance de la progression de la réplication. C'est un acteur nécessaire pour la protection cellulaire contre les stress réplicatifs intrinsèques à la phase S. Les études [212,213] ont démontré que sa suppression était létale chez les cellules embryonnaires à la fois murine et humaine. C'est ce constat qui a attiré les chercheurs à l'étudier davantage.

ATR est activée par un large spectre de dommages à l'ADN, dont les CDB en plus du stress réplicatif.

**Les capteurs** : Lorsque les ADN-polymérases sont bloquées au niveau des fourches lors de la réplication de l'ADN, les hélicases continuent à relaxer l'ADN en amont de la fourche de

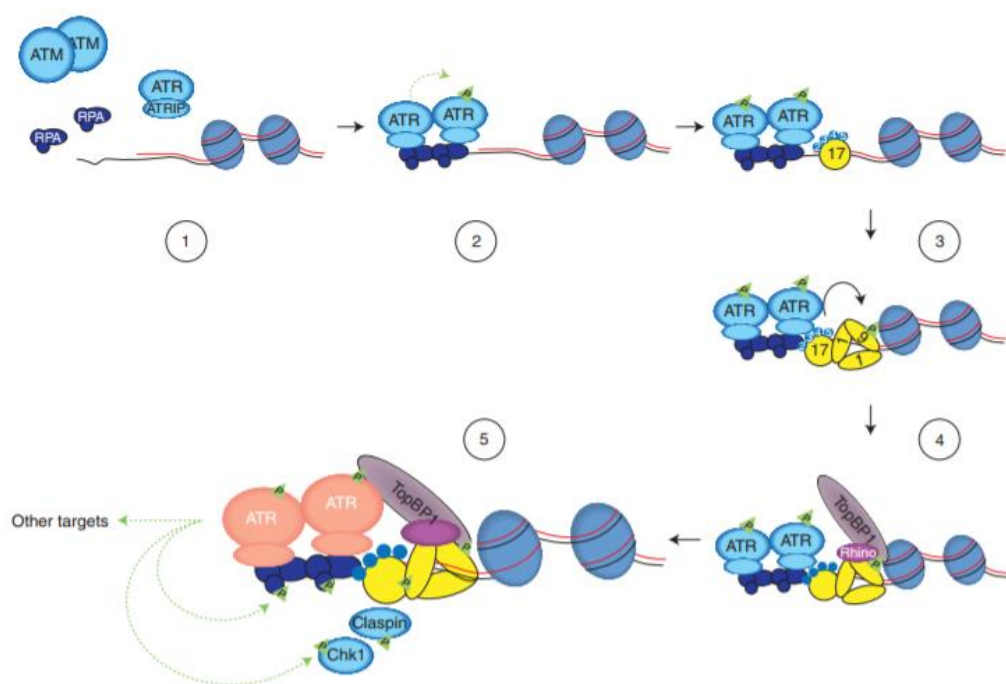


réplication, conduisant à la production de longues régions d'ADN simple brin (ADNsb). Cette structure de l'ADN va être captée par plusieurs protéines RPA (Replication Protein A) qui agissent comme des récepteurs du blocage de la réplication [204,212]. Ces protéines vont avoir une double action :

- Chacune d'entre elle va recruter ATR sous forme d'hétérodimère ATR-ATRIP puis l'activer par autophosphorylation.
- D'autre part elles vont recruter le complexe Rad17/RFC2-5 au niveau de l'extrémité ADNsb/ADNdb.

Le complexe Rad17/RFC2-5 va recruter le complexe 9-1-1 (hétérotrimère RAD9-HUS1-RAD1) sur l'ADNdb qui va être phosphorylé par ATR. Enfin le complexe 9-1-1 phosphorylé recrute la protéine TopBP1 (Topoisomerase binding protein 1) au niveau de l'ADNdb nécessaire à l'activation totale d'ATR (en rose sur le schéma).

Ce processus d'activation en plusieurs étapes assure que la protéine ATR est activée uniquement lorsque la jonction ADNdb/ADNsb et l'ADNsb sont présents simultanément, fournissant un signal de dommage de l'ADN sécurisé et spécifique du stress réplcatif. (Figure 19)



**FIGURE 19 :** La voie ATR [214]

**Les effecteurs** : Une fois activé, ATR va déclencher une cascade de signalisations coordonnant dans l'ordre chronologique l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et le redémarrage des fourches de réplication bloquées [212, 214].

Concernant la régulation du cycle cellulaire, elle commence par le recrutement et puis la phosphorylation par ATR de la protéine Claspin. Une fois localisée au niveau de l'extrémité ADNsb/ADNdb, la Claspin phosphorylé va recruter Chk1 et permettre son rapprochement avec ATR. Par la suite ATR va phosphoryler Chk1 afin qu'il puisse se dissocier de la Claspin pour interagir avec ces cibles nucléaires et cytoplasmiques. [215]

Ainsi, Chk1 induit simultanément :

- la dégradation de Cdc25A aboutissant à l'inhibition de Cdk2 (associée avec les cyclines E et A pour le fonctionnement des origines de réplication)
- la séquestration de la phosphatase Cdc25C dans le cytoplasme sous forme inactive (associée aux protéines 143-3), inhibant sa capacité à déphosphoryler et activer Cdk1, et par conséquent inhibant également l'entrée en mitose

L'arrêt prolifératif induit par la voie ATR repose principalement sur ces deux mécanismes faisant suite à la phosphorylation des complexes régulateurs majeurs Cdk/Cycline par Chk1. La conséquence est un arrêt du cycle cellulaire en intra-S et G2/M, afin de ralentir la progression de la réplication de l'ADN et de réparer l'ADN endommagé avant la mitose [212,214,215].

Une fois le blocage du cycle établi, ATR peut recruter les mécanismes de réparation en fonction du type de lésions. Notons qu'une fois la réparation effectuée, le redémarrage de la fourche de réplication est ATR-dépendant.

La voie ATR a également pour effecteur les acteurs de signalisation de l'apoptose dont la protéine Bid dans le cas de la persistance des dommages à l'ADN et/ou de l'absence de leur réparation. Bid interagit avec la sous-unité ATRIP et RPA et facilite l'accumulation des protéines ATR sur la chromatine durant le stress répliatif. [216]

**La régulation** : À l'instar de la voie ATM, ATR est également soumise à des régulations par les miARNs régulant l'expression d'ATR, Chk1, CDC25A. Tandis que Chk1 est susceptible d'être

phosphorylée par d'autres voies de signalisation aboutissant à une modulation de sa fonction. [206]

Par principe, la voie de signalisation ATR est particulièrement active dans les cellules de fort pouvoir prolifératif, c'est-à-dire lorsque les réplifications sont rapides et nombreuses. C'est le cas des cellules souches, des cellules du système immunitaire mais également des cellules cancéreuses. Des mutations affectant les protéines de la voie ATR sont également associées au développement de cancers ou de pathologies dégénératives. Les patients atteints du syndrome de Seckel caractérisé par un retard de croissance intra-utérin, de retards mentaux et de microcéphalie, présentent une mutation du gène codant la protéine ATR [181].

### c. Dialogue croisée et travail commutatif ATR-ATM

ATM et plus particulièrement ATR sont des acteurs critiques dans la réponse aux lésions double brin de l'ADN et dans l'induction des checkpoints du cycle cellulaire. Ceci suggère qu'elles ont une activité non redondante et que leurs fonctions transductives centrales sont à la fois spécifiques pour chacune et complémentaire entre elles.

Le travail commutatif d'ATR et d'ATM peut se manifester pour une même lésion sur l'ADN. Lorsqu'une CDB survient pendant la phase G1, c'est la voie ATM qui va s'initier en déclenchant le mécanisme de réparation par jonction d'extrémités non-homologues ou NHEJ. C'est une voie rapide et robuste active tout au long du cycle cellulaire mais faiblement efficace pour de larges cassures. Lorsque la CDB survient pendant la phase S ou G2 les systèmes transducteurs ATR et ATM peuvent faire appel à un mécanisme de réparation plus perfectionné. Il s'agit de la recombinaison homologue ou RH qui utilise un brin matrice homologue pour la réparation et qui est initié par la dégradation, de part et d'autre de la cassure du brin d'ADN. Cette étape, dite de résection, expose un ADNsb. [200,212]

Ainsi, ATM va reconnaître dans un premier temps la CDB, puis réguler le cycle cellulaire et initier la réparation par RH par la résection. Mais l'exposition d'un ADNsb lors de cette étape va progressivement activer ATR qui va phosphoryler des effecteurs Mre11, CtIP, Exo1 qui vont à leur tour inhiber progressivement ATM. Il y a donc un phénomène de switch des voies ATM vers ATR [217].

Le dialogue croisé ou cross-talk des voies ATR-ATM s'articule autour de 4 points [218] :

- Le premier point repose sur le travail commutatif décrit ci-dessus dont la conséquence directe est l'influence réciproque de leur localisation sur les lésions de l'ADN. D'une part ATM entraîne le recrutement d'ATR en initiant la résection de l'ADNsb au niveau de la lésion. Par ailleurs, ATR a la capacité de phosphoryler les histones H2AX en réponse à un stress répliatif ce qui recrute la protéine ATM sur des régions de la chromatine adjacente aux fourches de réplication.
- ATR et ATM peuvent se phosphoryler de manière directe et réciproque.
- ATR et ATM peuvent également affecter réciproquement la fonction et la localisation de leurs effecteurs. En effet ATM peut phosphoryler TopBP1 et promouvoir sa liaison avec ATR. ATM peut également recruter TopBP1 sur les foyers de foci  $\gamma$ H2AX directement de part et d'autre de la CBD. [217,218]
- Enfin d'après [219] même s'il n'y a pas de redondance dans leurs fonctions respectives, certaines conditions biochimiques entraînent une substitution de leurs rôles. Par exemple, lorsque la signalisation ATR est compromise lors d'un stress répliatif, l'effondrement des fourches de répliations va activer ATM. C'est un point essentiel de la stratégie thérapeutique développé dans le chapitre III.

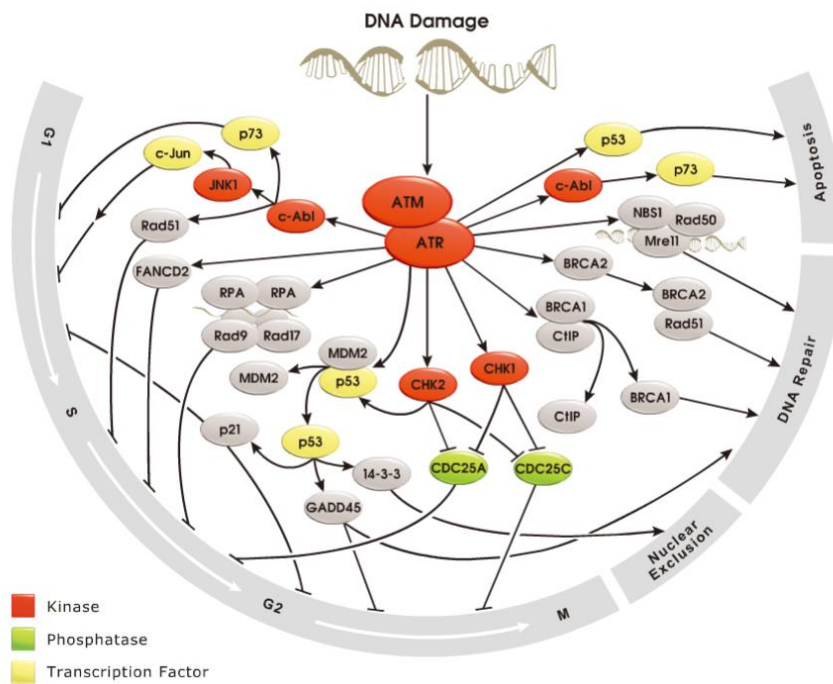


FIGURE 20 : Relation ATR/ATM [218]

#### d. La voie DNA-PK

La voie de signalisation DNA-PK (*DNA dependant protein kinase*) est une autre réponse aux dommages de l'ADN de type CDB fonctionnant à tout moment du cycle cellulaire. Au niveau biochimique, le complexe DNA-PK est un hétérotrimère composé de :

- 2 sous-unités Ku : Ku70 et Ku80 qui ont pour rôle de se fixer à l'ADN et de rapprocher les extrémités et de recruter les autres protéines impliquées dans le mécanisme du NHEJ [199].
- La sous-unité DNA-PKc qui porte l'activité kinase.

Du fait de son absence de lien avec la dernière partie, les mécanismes intimes de son activation ne seront pas détaillés. Cependant, il est important de préciser qu'elle est la principale voie d'activation du mécanisme de réparation de la jonction des extrémités non-homologue (NHEJ) que nous détaillerons ultérieurement [214].

Comme ATM, la voie DNA-PK est régulé par des mécanismes de phosphorylations, d'ubiquitylations mais également par des miARNs. [205, 206]. Elle serait d'une importance particulière dans les phénomènes de maturation du système immunitaire notamment la machinerie de recombinaison V(D)J. C'est un processus qui met en jeu des coupures double brin de l'ADN et le rôle de DNA-PK protégerait les extrémités de l'ADN de l'action inappropriée des nucléases cellulaires. Du fait de son implication dans ces processus de maturation du système immunitaire, la mutation des gènes codant la protéine DNA-PK cause une immunodéficience sévère chez les patients T-B « SCID » [220,233].

### 3. Le couplage avec les systèmes de réparations de l'ADN

Dans le cadre de la DDR, de nombreux processus cellulaires sont induits par l'activation des voies de signalisation ATM, ATR et DNA-PK comme vue précédemment (section II. B.1). Parmi les nombreux effecteurs de ces voies on retrouve les acteurs des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN. Ces systèmes de réparation sont spécifiques d'un type de lésion et sont étroitement couplés aux acteurs de régulation du cycle cellulaire. De ce fait, ils sont cycle-dépendants. Chez les cellules eucaryotes, les différents dommages de l'ADN décrits plus haut (section II.A.3) sont réparés par 5 mécanismes de réparations distincts par les acteurs impliqués.

Pour les lésions d'ADN simple brin, nous présenterons brièvement :

- La réparation par excision de base ou *base excision repair* (BER)
- La réparation par excision de *nucleotides excision repair* (NER)
- La réparation des mésappariements ou *mismatch repair* (MMR)

Pour les lésions touchant les deux brins d'ADN tel que les CDB, nous détaillerons :

- La réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)
- La réparation par recombinaison homologue (RH)

Il existe une sixième catégorie de mécanisme de réparation de type *ad hoc* par réversion directe, spécifique d'une altération biochimique précise. Il s'agit par exemple de la photolyase pour les dimères de thymine, méthyltransférases pour O6-méthylguanosine, 1-méthyladenosine, 3-méthylcytidine, etc. Ce mécanisme ne sera pas détaillé dans la suite de notre étude

Enfin, il existe une voie tolérance à l'altération, ce qui maintient l'erreur dans l'ADN, puis dépassée lors de la réplication : il y a formation d'un trou qui peut être comblé et réparé par la suite sur la nouvelle chaîne. [200]

#### a. Réparation des dommages simple brin de l'ADN

Les systèmes de réparations des lésions simple brin sont très efficaces chez les eucaryotes. Ils sont actifs tout au long du cycle cellulaire. En phase S et G2, ces mécanismes de réparation sont ATR-dépendants.

##### i) La réparation par excision de bases (BER)

Elle est utilisée pour réparer les modifications chimiques d'une à une dizaine de base azotées survenues par oxydation, désamination ou alkylation et pour les CSB.

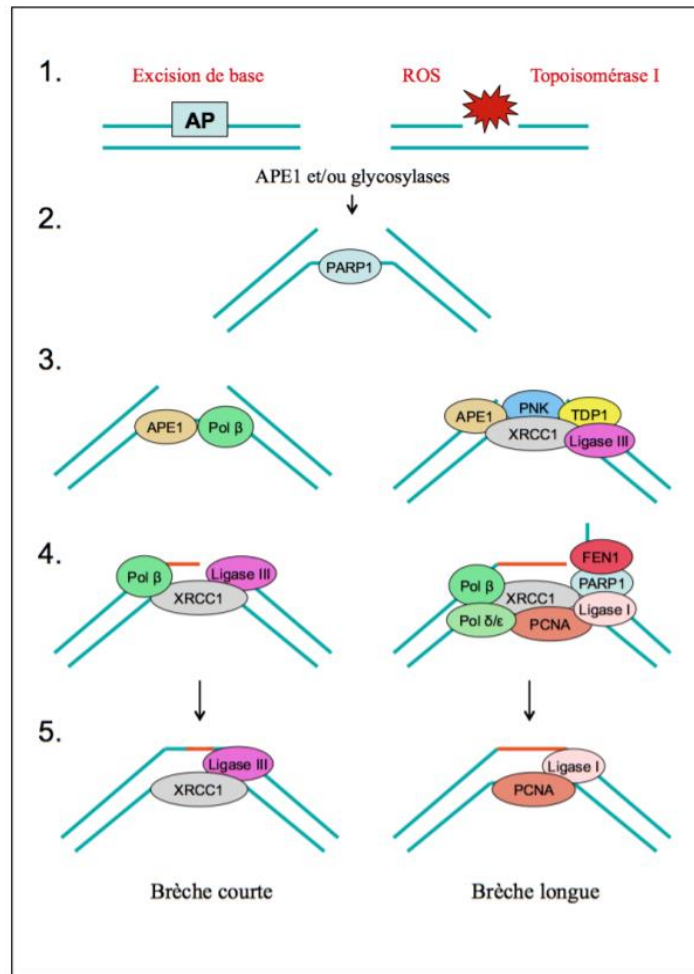
Elle se déroule en 4 étapes [222] :

- Une étape de reconnaissance, puis de suppression des bases endommagées par le complexe l'ADN glycosylase/PARP-1 spécifique de la chaque base qui hydrolysent la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose créant ainsi un site abasique ou AP (site apurique/apyrimidique)
- Les sites AP sont alors pris en charge par l'endonucléase APE1 qui clive la liaison phosphodiester en 5' du site abasique aboutissant à la cassure simple brin dans l'ADN. PARP-1 recrute le facteur de réparation XRCC1.

- A partir de cette étape, le BER s'engage dans la réparation des CSB qui se subdivisent en deux voies distinctes selon la taille de la lésion :
  - Réparation par brèche courte (short-patch) portant sur 1 nucléotide. XRRC1 va recruter puis stabiliser l'ADN polymérase  $\beta$  qui va combler la brèche d'un nucléotide. Puis XRRC1 va recruter l'ADN ligase III.
  - Réparation par brèche longue (long-patch) portant sur 2 à 12 nucléotides. XRRC1 va recruter plusieurs intervenant dont PNK, TDP1, l'ADN ligase I et les ADN polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$  mais également  $\beta$ . D'abord il y a la synthèse du brin en position 3' au niveau de la cassure par l'ADN polymérase désignée en utilisant le brin d'ADN non-endommagé comme matrice. Puis le clivage des nucléotides déplacés en 5' au cours du remplissage de la brèche par FEN1 (Flap endonucléase 1).
- Enfin, le complexe XRCC1-ADN ligase I ou III recruté par PARP-2 effectue la ligation.

Notons que les protéines PARP-1 et PARP-2 sont définies comme des éléments clés dans ce processus de réparation [187]. Une déficience de ce mécanisme (par mutation de la polymérase  $\beta$  et de la glycosylase MutY) est associée à une dégénérescence neurologique, un dysfonctionnement du système immunitaire, un vieillissement prématuré et une prédisposition à certains cancers [221].





**FIGURE 21** Les deux voies du système de réparation BER [222].

Détection par le complexe PARP-1 traitements des extrémités de la cassure, remplissage de la brèche et ligation achevant la réparation de la lésion.

## ii) La réparation par excision de nucléotides (NER)

Le système NER est principalement activé par les lésions liées à la structure de l'ADN induit par des adduits volumineux de l'ADN, ou des pontages intra et inter-brins. Des études récentes ont montré que ce système est couplé à la transcription des ARN. [223]

On distingue 2 types de NER :

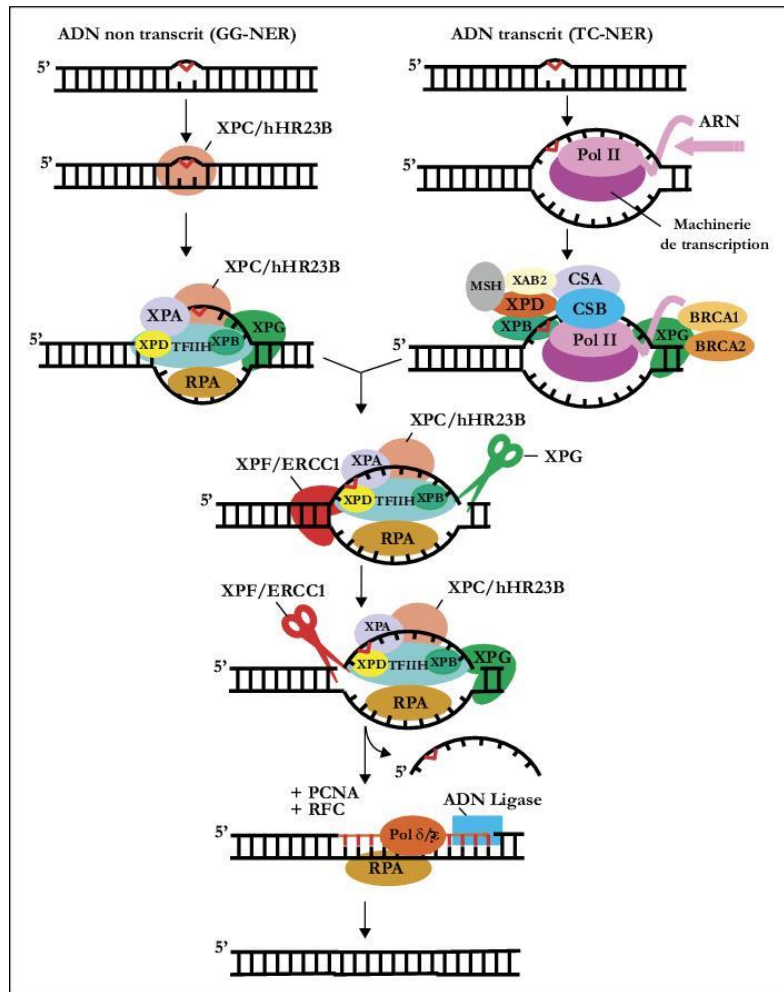
- La réparation génomique globale (GG-NER) assurant la réparation des domaines présentant des distorsions de l'hélice d'ADN.

- La réparation couplée à la transcription (TC-NER) corrigeant les dommages survenant lors de l'étape d'élongation de la transcription des ARN, plus particulièrement lorsque l'ARN polymérase II est bloqué à la suite d'une lésion sur le brin matrice.

Ce système se déroule en cinq étapes [224] :

- Les lésions sont reconnues soit directement par un complexe récepteur composé des protéines XPC/RAD23B/CETN2/UV-DDB dans le système GG-NER, soit indirectement par l'ARN polymérase II dans le système TC-NER.
- Le facteur de transcription TFIIH recruté au niveau de la lésion va procéder à l'ouverture des deux brins d'ADN autour de la lésion, du fait de l'activité hélicase de sa sous-unité XPD générant ainsi 2 domaines d'ADNsb. La protéine RPA (replication protein A) recouvre l'ADNsb non-endommagé.
- Le facteur TFIIH recrute une endonucléase spécifique, XPF-ERCC1 qui est dirigée vers le brin d'ADN endommagé pour générer une incision en 5' de la lésion. XPG est alors activée et assure le clivage en 3' de la lésion libérant ainsi une région de 22 à 30 nucléotides comportant la lésion.
- La protéine trimérique PCNA (proliferating cell nuclear antigen) présente au niveau de l'incision 5' recrute les ADN pol afin de synthétiser fidèlement la région d'ADN qui a été excisée.
- Les ligases permettent de finaliser la ligature de l'ADN (Figure 22.)

Une déficience du mécanisme de réparation NER entraîne une prédisposition à certains cancers notamment chez les patients atteints de la maladie Xeroderma Pigmentosum (résultant de la non-fonctionnalité du système NER), mais elle peut également être impliquée dans des défauts de développement neuronal associés à un vieillissement prématuré comme cela a été décrit dans le syndrome Cockayne [225]



**FIGURE 22** : Le système de réparation NER [224]

### iii) La réparation des mésappariements des bases (MMR)

Le système de réparation MMR joue un rôle majeur dans la correction des erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN. Ce système constitue la deuxième ligne de défense contre les erreurs de réplifications, la première étant la relecture du brin nouvellement synthétisé par l'ADN polymérase elle-même.

- Chez les eucaryotes, la reconnaissance des mésappariements se fait par le complexe protéique MutSα. MutSα va recruter MutLα présentant une activité ATPase et endonucléase. Le transfert d'énergie via l'ATP permet au complexe MutS/MutL de

glisser le long du brin d'ADN jusqu'à la protéine PCNA préalablement recrutée au niveau de la cassure de l'ADN par le RFC (Facteur de réplication C).

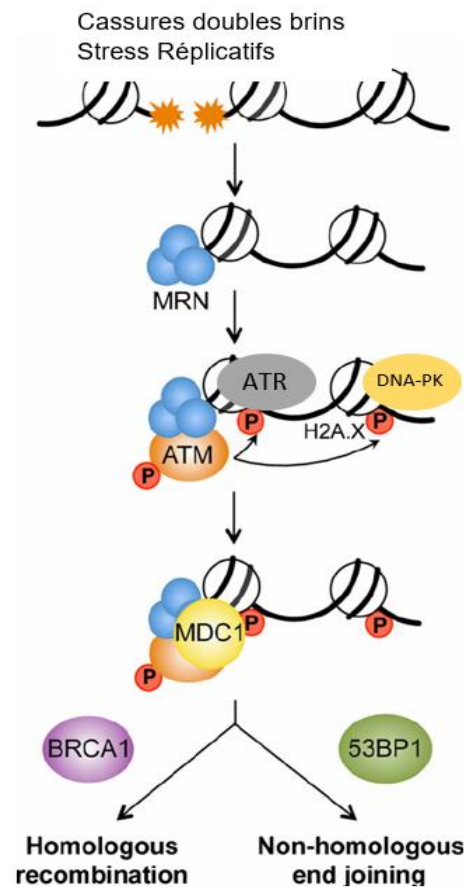
- L'activité endonucléase de MutL est alors activée ce qui génère une nouvelle CSB à proximité du mésappariement.
- L'étape d'élimination de la région affectée par le dommage est assurée par l'exonucléase 1 (Exo1) qui dégrade le brin d'ADN muté depuis la cassure jusqu'à 150 nucléotides au-delà du mésappariement. Le brin d'ADN complémentaire non-muté est protégé des nucléases cellulaires par l'association de protéines RPA.
- Le complexe de réparation se détache alors de l'ADN permettant le recrutement de l'ADN polymérase  $\delta$  assurant la synthèse de la portion d'ADN à partir du brin matrice non-muté.
- Enfin, l'ADN ligase I assure la ligation de ce fragment d'ADN néosynthétisé au reste de la molécule d'ADN.

L'inactivation de la voie de réparation MMR à la suite de la mutation des gènes codant les protéines MutS et MutL engendre une augmentation de la fréquence des mutations spontanées dans la cellule et un accroissement de l'instabilité génétique, notamment dans les régions de microsatellites, aboutissant au phénotype d'instabilité des régions microsatellites (MSI) et prédisposant à la carcinogenèse. Ainsi, une déficience de MMR est à l'origine du syndrome de Lynch II, ou le Cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). De même, il a été démontré que le syndrome de Turcot caractérisé par le développement d'une tumeur cérébrale primaire associée à de multiples adénomes colorectaux chez l'enfant serait causé par l'inactivation du MMR. [226]

## b. Réparation des dommages double brin de l'ADN

Les stress réplicatifs et CSB sont les dommages les plus délétères pour la cellule. Bien qu'elles ne soient pas les plus fréquentes, elles sont à l'origine de la majorité des mutations et aberrations chromosomiques. À la suite de leurs détections par les protéines traductrices centrales ATM, ATR et DNA-PK décrit plus haut (section II.2), les lésions double brin vont être prises en charge par 2 mécanismes de réparations de nature complexes dont certaines

interactions entre les différents acteurs n'ont pas encore été élucidées. L'activation de ces 2 mécanismes de réparation dépend à la fois de la nature des dommages et de la phase du cycle cellulaire.



**FIGURE 23 :** Activation des mécanismes de réparations des CDB. [227]

Le premier pas divergent entre les deux mécanismes de réparations est la résection terminale du brin lésé. Les protéines BRCA1 et 53BP1 jouent un rôle dans la détermination de l'équilibre entre les deux voies. 53BP1 limite la résection et favorise le NHEJ. [227]

## i) La réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)

Le NHEJ est une voie de réparation des CDB actif à tout moment du cycle cellulaire. Mais il est particulièrement indispensable en phase G1 et au commencement de la phase S. Son mécanisme repose sur la jonction entre les deux extrémités de la cassure dans l'ADN.

Le NHEJ comprend 2 voies distinctes par les acteurs protéiques, leur fidélité ainsi que leur rapidité :

- Le NHEJ « classique » (c-NHEJ) dépendant de la voie DNA-PK.
- Le NHEJ « alternatif » (alt-NHEJ) indépendant des acteurs de la voie classique connu également sous le nom de Microhomology-mediated end joining (MMEJ) au fonctionnement complexe, encore mal élucidé.

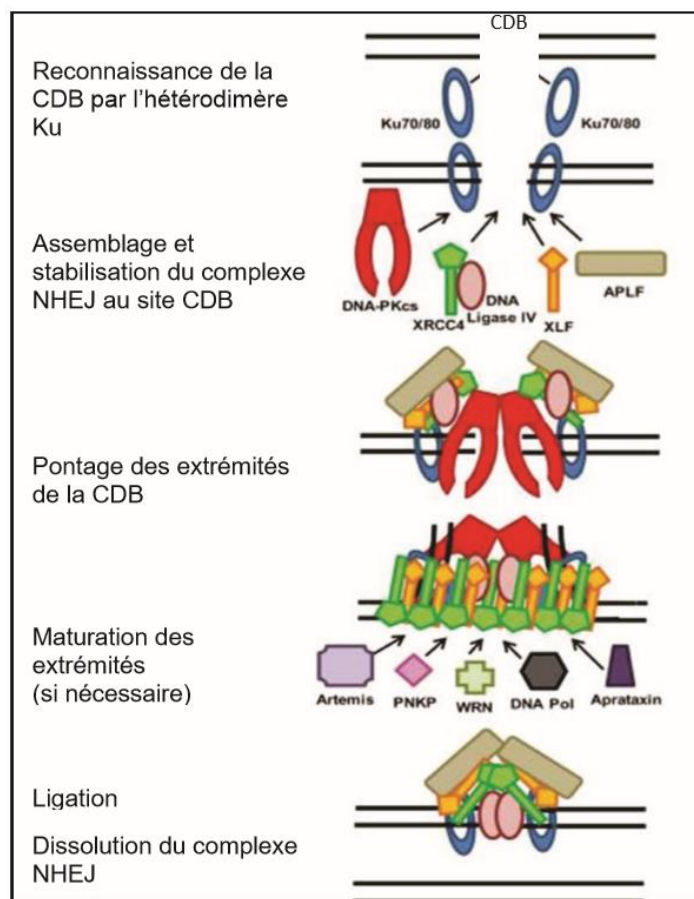
### La voie NHEJ classique ou c-NHEJ [229]

La c-NHEJ est un mécanisme dynamique, rapide, effecteur principal de la voie DNA-PK. Elle est également mise en place par la voie ATM via l'activation de la protéine p53 et 53BP1 (p53-binding protein 1). La voie de réparation se décompose en 5 étapes (Figure 24) :

- En premier lieu, les sous-unités Ku70/80 du DNA-PK procèdent à la reconnaissance des extrémités des CDB, puis vont recruter la sous-unité catalytique DNA-PKc
- Le complexe DNA-PK activé crée des foyers d'histone H2AX phosphorylé ce qui a pour effet de relaxer la chromatine à proximité de la cassure. Il va parallèlement recruter les facteurs clés nécessaires à la ligature des extrémités de la lésion telle que l'ADN ligase IV et ses cofacteurs XRCC4 et XLF qui vont alors former un complexe stable formant un pont au niveau de la CDB. A partir de cette situation, deux cas de figure peuvent se présenter :

- 1) Les 2 extrémités juxtaposées de la cassure peuvent être directement reliées
- 2) Les 2 extrémités ne peuvent pas être reliées correctement

- Dans le cas numéro 1, le processus de ligation est assuré directement à l'ADN ligase IV couplé aux cofacteurs XRCC4 et XLF.
- Dans le cas numéro 2, il y a un nettoyage des extrémités 5'-phosphate et 3'-OH de la CDB par PNK (Poly-Nucleotide Kinase).
- Le complexe DNA-PK s'autophosphoryle puis recrute et phosphoryle la protéine Artemis ce qui actionne son activité endonucléasique. Artemis va digérer les structures en épingle à cheveux. Cette résection participe au maintien de l'alignement des extrémités de la cassure. Les extrémités simples brins générées sont ensuite transformées en extrémités doubles brins par l'action des ADN polymérases  $\lambda$ .
  - Enfin, la ligation des extrémités doubles brins par le complexe ADN ligase IV/XRCC4 dont l'activité est stimulée par XLF.



**FIGURE 24** : La réparation des dommages double brin de l'ADN de la voie jonction d'extrémités non homologues classique [229].

Si les extrémités juxtaposées peuvent être liguées directement, le système passe directement à l'étape 5.

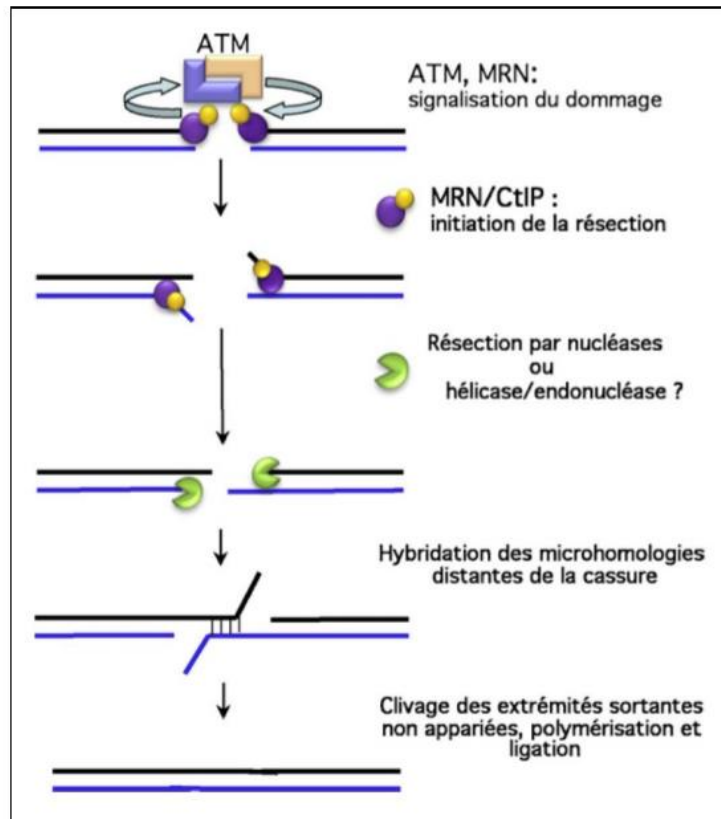
### **Le NHEJ « alternatif » (alt-NHEJ) ou Microhomology-mediated end joining (MMEJ) [228]**

Le MMEJ est un mécanisme de réparation qui n'est pas totalement élucidé tant sur sa fonction que sur ses acteurs protéiques. Cette voie dérivée du mécanisme c-NHEJ a été initialement décrite comme une voie de secours permettant à la cellule déficiente de la voie classique de survivre et sans pour autant devoir faire appel à la recombinaison homologue (RH). De ce fait, elle fut initialement appelée « *Backup-NHEJ* » en référence à son rôle de voie de sauvetage.

Cependant, certaines études ont montré que le MMEJ était privilégié au c-NHEJ, même si celui-ci était fonctionnel. Le MMEJ n'apparaît donc plus comme une voie de secours en attente d'une défaillance de la voie classique, mais comme une voie indépendante disposant de son propre champ d'action dans certains mécanismes cellulaires. Et bien qu'il ne soit pas complètement élucidé, des études successives ont permis de décrire une ébauche de mécanisme séquentiel (Figure 25) :

- La voie MMEJ est indépendante du transducteur DNA-PK de la voie classique. La reconnaissance des CDB puis l'activation de la voie alternative s'effectue entièrement par la signalisation ATM.
- Une fois PARP-1 recruté au niveau de la brèche, elle s'automodifie et recrute successivement XRCC1, l'ADN ligase III, l'ADN polymérase  $\beta$  puis le complexe MRN qui par l'activité endonucléase de la sous-unité Mre11 effectue la résection des extrémités de la cassure.
- Par la suite, le mécanisme MMEJ ligature des séquences micro-homologues de 5-25 paires de bases aux ADNsb déphasés dans l'alignement des extrémités. Ceux-ci génèrent des volets d'ADN sortant non-appariés qui sont clivés aboutissant à la délétion de nucléotides.
- L'ADN polymérase  $\beta$  synthétise la séquence d'ADN qui lie les séquences micro-homologues aux extrémités de la lésion.
- Enfin, l'ADN ligase III lié à XRCC1 catalyse la ligation.





**FIGURE 25** : La réparation des dommages double brin de l'ADN par la voie MMEJ [230]

### **Le c-NHEJ vs. MMEJ**

Le NHEJ a souvent été décrit comme un mécanisme « *error prone* » c'est à dire sujet aux erreurs, du fait qu'elle est fréquemment associée à la présence de petites insertions et de délétions sur le site de la cassure, source de mutations [231]. Cependant, selon l'étude [230] il s'avère que le mécanisme NHEJ classique repose sur une méthode intrinsèquement fiable ce qui la rend plutôt conservatif de la séquence. Quant à la mutagénèse résultant de son action, elle viendrait de l'absence de complémentarité des extrémités qu'elle doit liguer. De ce fait, la qualité et la fidélité de la réparation ne dépendrait pas du système c-NHEJ en lui-même mais serait plutôt attribuable à la structure des extrémités de la CDB.

Ce n'est pas le cas de la voie MMEJ qui a la particularité de faire appel à des séquences microhomologues pour la réparation, ce qui est potentiellement générateur de délétions. Ce

mécanisme ne prend pas en compte les paires de bases perdues pendant la cassure ou supprimées pendant le clivage des volets simple brin afin de ligaturer l'ADN. Par conséquent, ce processus n'est pas un mécanisme de réparation fidèle du fait de l'absence de vérification de la cohérence de la séquence nouvellement synthétisée. De ce fait, il apparaît que les erreurs commises par le mécanisme NHEJ, qui sont sources de mutations sont essentiellement dues à la voie alternative. [227]

La théorie générale actuelle de sélection de l'un ou de l'autre des mécanismes NHEJ repose sur la nature même des extrémités des CDB à réparer. De façon imagée le NHEJ s'adapte à la cassure : si celle-ci est relativement « propre », le c-NHEJ est utilisé et la réparation ne génère pas d'erreur ou très peu. Au contraire, si la cassure présente des extrémités « compliquées », le MMEJ est préféré mais fera apparaître des modifications de séquence. [232]

Cependant cette source de mutation est un mécanisme physiologique indispensable dans la recombinaison des séquences V(D)J. Ce processus, par lequel la diversité des récepteurs des lymphocytes B et T est générée dans le système immunitaire, couple des régions «variables» (V), «diversité» (D) et «joignantes» (J) qui, lorsqu'elles sont assemblées, codent pour la région variable d'un gène de récepteur de cellule B ou de cellule T. Contrairement au NHEJ classique, dans lequel une réparation précise est le résultat le plus favorable, une réparation MMEJ sujette à erreur dans la recombinaison V(D)J est bénéfique du fait qu'elle maximise la diversité dans la séquence codante de ces gènes. Les patients présentant des mutations dans les gènes NHEJ sont incapables de produire des lymphocytes B et des cellules T fonctionnels et souffrent d'immunodéficience combinée sévère (SCID). [176,233]

Plusieurs syndromes humains sont associés à un NHEJ dysfonctionnel. Les mutations touchant l'ADN ligase IV et XLF provoquent deux syndromes SCID, distincts. Ces syndromes partagent de nombreuses caractéristiques, y compris la radiosensibilité cellulaire, la microcéphalie, en plus de SCID. Les mutations de la protéine Artemis provoquent également un SCID, sans atteinte neurologique associé. La différence de gravité peut s'expliquer par les rôles des protéines mutées. [234]

## ii) La recombinaison homologue

La RH est le deuxième mécanisme de réparation des CDB et celui des stress réplcatifs. C'est une voie de réparation lente, et « fidèle » à l'opposé de la voie NHEJ puisqu'elle répare l'ADN endommagé à partir du brin d'ADN complémentaire non lésé. La présence d'une chromatide sœur est donc indispensable à la mise en œuvre d'une réparation par RH. De ce fait, elle n'est active que pendant et après la réplication c'est-à-dire en phase S et G2. [214]

Le mécanisme de réparation RH est un effecteur commun de la voie ATM et ATR selon l'origine de la lésion. [204]

### **Mise en place de la RH** [212,214]

- Une fois ATM/ATR activé au niveau des foci de foyers  $\gamma$ H2AX, il y a recrutement de Mdc1 qui recrute à son tour l'ubiquitine ligase RNF8 au niveau des CDB.
- RNF8 recrute une autre ubiquitine ligase RNF168 dont les effecteurs sont les histones du foyer  $\gamma$ H2AX. RNF168 étend les chaînes d'ubiquitine liées aux histones.
- Ces chaînes sont reconnues ultérieurement par RAP80, qui forme un complexe avec BRCA1 et Abraxas.
- Enfin BRCA1 recrute la protéine Rad 51 qui initie la RH.

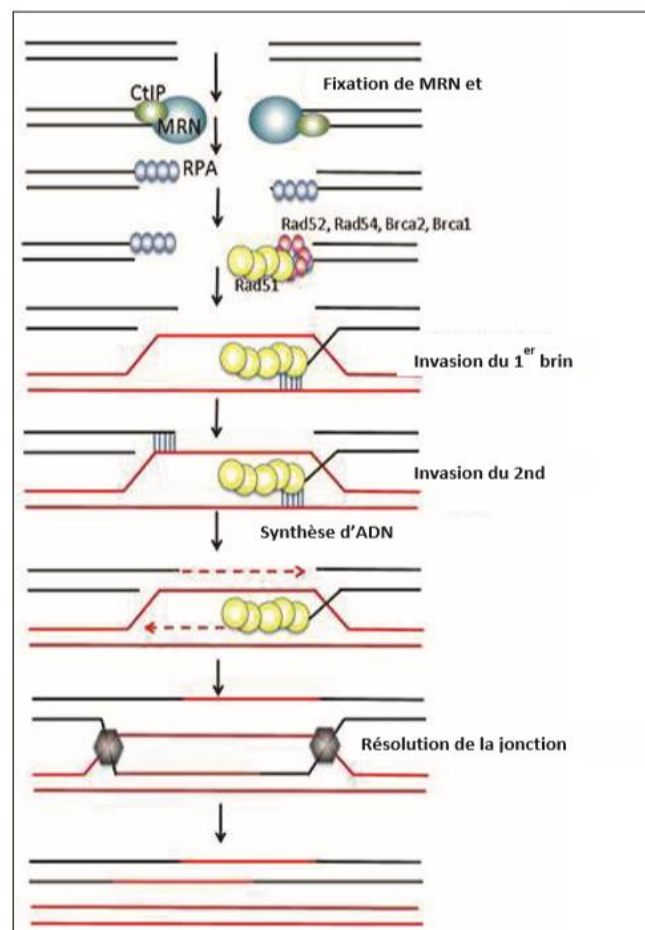
Cette voie est coordonnée avec le recrutement de 53BP1 par RNF168 au niveau des histones di-méthylés autour de la CDB. 53BP1 inhibe le recrutement de BRCA1 et donc l'initiation de la RH. Cependant elle active la voie c-NHEJ décrite ci-dessus. [227]

Ceci démontre une coordination complète des systèmes de réparations des CDB en intégrant un système de régulation réciproque. (Figure 26)



Ce complexe stabilisé par Rad54 forme un nucléofilament capable de venir envahir la chromatide sœur. Cette structure est appelé D-loop.

- Une phase synaptique assurée par Rad51 qui recherche de la séquence matricielle homologue sur le brin complémentaire et permet l'invasion du brin d'ADN reséqué au niveau de l'ADN de la chromatide sœur.
- Une phase post-synaptique assurée par l'ADN polymérase  $\delta$  qui débute la synthèse de la séquence d'ADN complémentaire à l'extrémité du brin 3', ce qui transforme la structure D-loop en une double jonction de Holliday. Cette structure particulière de l'ADN sera finalement résorbée par des résolvases et des ligases achevant ainsi la réparation. Enfin la Topoisomérase III intervient pour éviter la génération de crossing-over.



**FIGURE 27** : La réparation des dommages double brin de l'ADN par recombinaison homologue [230]

Une déficience du système de réparation RH est impliquée dans deux types de pathologies majeures : de multiples cancers dont le plus reconnu est le syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire et dans l'anémie de Fanconi. [235]

Des insertions ou délétions des gènes BRCA 1 et BRCA 2 sont à l'origine d'un risque accru du cancer du sein. Le produit protéique issu du gène BRCA 1 et/ou 2 muté est anormal et ne fonctionne pas correctement. Ceci conduit à une incapacité cellulaire de réparer les CDB plus une prolifération incontrôlée du fait d'un déficit du contrôle du cycle cellulaire. Il existe une spécificité tissulaire dans la survenue des cancers liés à ces mutations au niveau du sein et de l'ovaire. La stratégie thérapeutique développée pour traiter le cancer lié à ces mutations fait l'objet d'une description détaillée dans la section II.C.3. [235]

Les malades qui ont deux copies mutées du gène BRCA2 développent une anémie de Fanconi (FA). Ce syndrome décrit une maladie héréditaire autosomique récessive, caractérisée par un retard de croissance, des difformités du visage, une fertilité affectée ainsi que des anomalies squelettiques. Toutefois, la FA est surtout caractérisée par une insuffisance médullaire aboutissant à une pancytopenie sévère et une prédisposition aux leucémies myéloïdes aiguës. Cette condition est causée par des niveaux extrêmement réduits de la protéine BRCA2 dans les cellules, que l'on nomme également FANCD1 ce qui permet l'accumulation d'ADN endommagé. [236]

Des mutations du gène BRCA2 entraînent également un risque accru de cancer des ovaires, des trompes de Fallope, de la prostate, du pancréas, ainsi qu'un mélanome malin.

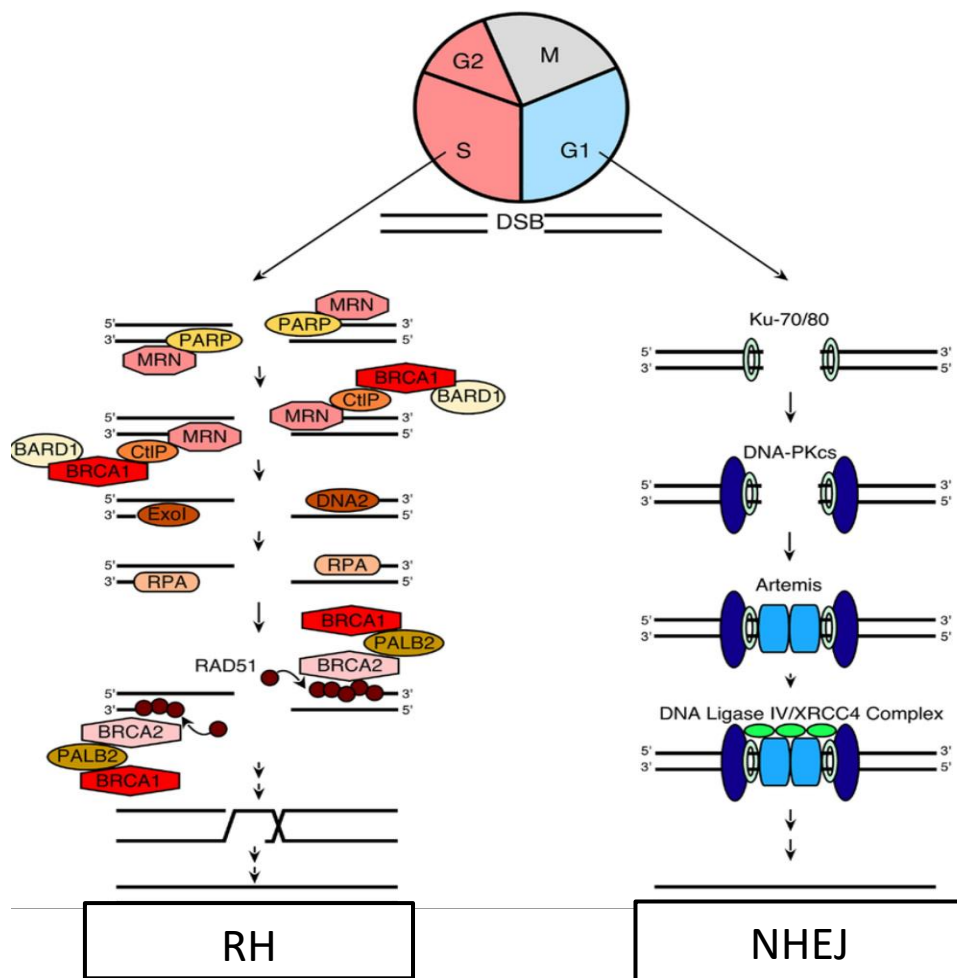
Des mutations du gène Rad51 sont également impliquées dans la FA, dans le syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire et dans la maladie très rare des mouvements en miroir congénitaux.

### iii) La coordination des mécanismes de réparations double brin

Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, seul le NHEJ classique et alternatif sont susceptibles d'intervenir tout au long du cycle cellulaire du fait de l'absence de la chromatide sœur indispensable à la RH. [237]

À partir de la phase S du cycle cellulaire, les 3 mécanismes de réparations sont disponibles. De ce fait la RH peut entrer en compétition avec le NHEJ. L'étude [239] démontre que le choix entre ces 2 voies se fait au niveau de l'étape de résection des extrémités de l'ADN via deux acteurs centraux :

- En phase G0/G1, la protéine BRCA1 existe à des niveaux très bas dans la cellule. La protéine 53BP1 responsable de l'induction de la voie NHEJ est capable d'inhiber la protéine CtIP, et du même coup empêcher le processus de résection exécuté par le complexe MRN, étape d'initiation de la RH.
- En phase S/G2, les concentrations en BRCA1 augmentent et tendent à inhiber l'activité de 53BP1, ce qui stimule CtIP, la résection des extrémités par le complexe MRN et initiée la RH (Figure 28)



**FIGURE 28** : Les mécanismes de réparations doubles brins en fonction de la phase du cycle cellulaire [237,238]

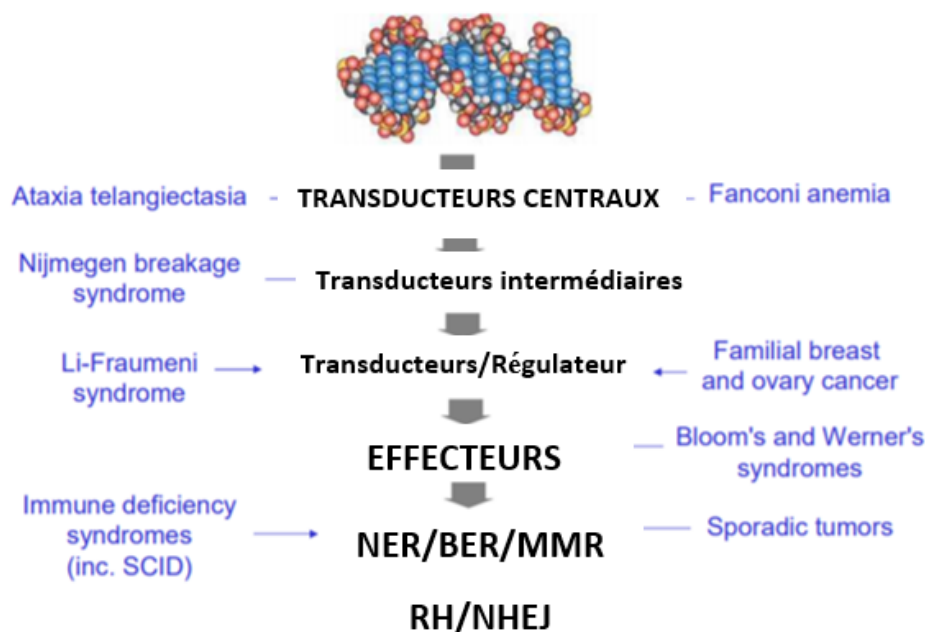
## C. LE CIBLAGE DES MÉCANISMES DE RÉPARATIONS

### 1. Les implications historiques de la DDR

Avant la perspective de son utilisation comme cible thérapeutique, il était communément admis que la DDR était impliquée dans 3 aspects majeurs :

#### a. Troubles du développements et maladies congénitales

Comme il a été décrit tout au long de la section II.B., en plus du risque accru de carcinogénèse et d'hypersensibilité aux radiations, les mutations des gènes codant pour les différents mécanismes de réparations sont à l'origine de malformations, de nombreuses maladies congénitales souvent très graves et parfois incompatibles avec la vie. La figure 29 décrit brièvement les pathologies associées aux mutations des acteurs de la DDR. [221,225,233-236]



**FIGURE 29** : Les maladies congénitales liées aux mutations des différents acteurs de la DDR



## b. L'exploitation thérapeutique des anomalies de la DDR

Paradoxalement cet état de chaos génomique pro-tumoral fournit des opportunités thérapeutiques. Les stratégies associant la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique ont déjà été utilisées dans le passé pour prévenir la progression du cancer en exploitant fondamentalement les altérations de la DDR. Plusieurs exemples illustrent ceci :

L'utilisation de sels de platine (carboplatine, cisplatine) associée au paclitaxel sont fréquemment administrés chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé. Ces agents alkylants induisent des ponts intra et inter-brins d'ADN, physiologiquement réparés par le système NER et RH. Ces agents sont efficaces dans 40 à 60% des cancers aux stades avancés de l'ovaire du fait de la défecion du système RH par mutation de BRCA1 et/ou BRCA2. Ce même traitement est très efficace chez les patients atteints du CBNPC du fait de la déficience du système NER par mutation de la protéine ERCC1. [240]

On retrouve cette stratégie dans le cas des cellules tumorales du glioblastome multiforme déficientes en MGMT (O-6-Méthylguanine-ADN méthyltransférase). Le témozolomide est un agent alkylant induisant des lésions en position O<sup>6</sup> et N<sup>7</sup> de la guanine et réparée en temps normal par la MGMT. Cet agent s'avère être efficace dans le glioblastome multiforme dans un premier temps car le promoteur de la MGMT serait hyperméthylé réduisant ainsi son expression. Les événements d'alkylation induits par témozolomide persistent incorrectement dans la liaison guanine-alkylée/thymidine pendant la réplication. Le mésappariement résultant est reconnu par le système de réparation MMR qui induit la mort cellulaire. [241]

Une autre stratégie consiste à cibler directement un effecteur de la DDR dans les cellules tumorales. Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II (Topo), que sont l'irinotécan et l'étoposide respectivement, pourraient être considérées comme « la première génération de TC » de la DDR. Les topo I contrôlent la structure topologique de l'ADN en réalisant une « décompaction » sélective et réversible de l'ADN super-enroulé indispensable aux différentes fonctions de transcription, réplication, recombinaison ou réparation. Selon l'étude [242] l'association d'un faible niveau d'expression des protéines BRCA1 et d'Aprataxine et un niveau

d'expression élevée de la topoisomérase I définissent un potentiel biomarqueur prédictif de réponse de l'irinotécan sur les tumeurs cibles. En effet cette spécialité est indiquée dans les cancers du tube digestif où elle est particulièrement efficace du fait d'un déficit du système RH (via BRCA1) et/ou du système NHEJ (via l'Aprataxine) associé à un niveau élevé d'expression de la cible.

### c. La résistance aux cytotoxiques

Comme il a été vu précédemment, l'incapacité de la cellule tumorale à réparer les dommages chimio induits peut déterminer sa sensibilité à l'agent cytotoxique. De la même manière la résistance de la cellule tumorale aux agents cytotoxiques peut s'expliquer par des mécanismes de réparation compétents procédant de manière directe (résistances aux platines) ou par des phénomènes d'adaptations biologiques (résistances aux 5-FU et à l'irinotécan). En effet, bien qu'il n'y ait pas de redondance entre les différentes voies de réparation, il peut y avoir sous la pression de facteurs chimiotoxiques des phénomènes de compensation du mécanisme défectueux par un autre mécanisme suboptimal assurant le phénomène de résistance. De ce fait, le lien de cause à effet entre un mécanisme de réparation et son rôle supposé dans les résistances des dommages chimio induits est complexe et plurifactoriel.

Pour illustrer cette résistance prenons trois exemples :

De la même manière qu'un système NER défectueux induit une chimio sensibilité des cellules tumorales aux sels de platines, ce système de réparation est à l'origine d'une résistance à ces mêmes agents lorsqu'il est effectif. La régulation positive de quelques acteurs clés du système NER est suffisant pour induire une chimiorésistance. Ainsi un taux d'expression élevé des protéines ERCC1 et XPA est associé à une résistance aux sels de platines dans les cancers gastriques, de l'ovaire avancé et du CBNPC. De nombreuses études ont pu confirmer le rôle déterminant du système NER dans la réponse aux chimiothérapies à base de platine. [243]

La Topo I a pour objectif de transformer le stade d'ADN super-enroulé au stade de gène accessible à la transcription ou à la réplication. Pour ce faire, l'enzyme se fixe sur l'ADNdb,

effectue une coupure simple brin et entraîne une étape de relaxation par une rotation de 180° du brin coupé autour du brin fixe pour permettre à l'ADN d'être répliqué. Ce complexe Topo I/ADNdb est appelé « complexe de clivage ». L'irinotécan s'intercale au niveau du complexe de clivage. Le complexe ADN/Topo I/Irinotécan, est stabilisé par un ensemble de ponts hydrogène entre l'Irinotécan et l'ADN d'une part et l'Irinotécan et la Topo I d'autre part. Ce complexe ternaire empêche la religation du brin d'ADN, générant une cassure simple brin de l'ADN ce qui inhibe la synthèse correcte de l'ADN [244]. Cependant l'enzyme Tdp1 (tyrosyl-ADN phosphodiesterases) du système de réparation BER peut hydrolyser la liaison covalente entre l'ADN et la topo I ce qui casse le complexe ternaire et court-circuite l'action de l'irinotécan. Dans de nombreux types de cancers colorectaux, les niveaux d'expression de Tdp1 sont plus élevés que dans les tissus normaux. [245]

De même, il a été démontré que la protéine PARP-1 régule l'activité de la Topo I. En effet lors de l'activation du système de réparation BER, la protéine PARP-1 catalyse la fixation de polymères poly (ADP-ribose) sur une gamme de protéines cibles nucléaires dont la topo I et PARP-1 elle-même. Au sein du complexe ternaire, la fixation de polymères poly (ADP-ribose) sur la topo I déstabilise le complexe qui quitte la coupure, permettant la réparation de la rupture d'ADN associé et favorise le redémarrage de la fourche de répllication [245,246].

Enfin, une déficience du système de réparation MMR, spécifiquement au niveau des gènes hMLH1 et hMSH2 sont à l'origine du phénotype d'instabilité des régions microsatellites (MSI) retrouvé dans certains types de cancers du côlon et de l'ovaire. Des études ont démontré que les cancers MSI+ développent une résistance à une large gamme de cytotoxiques tel que les anthracyclines, les agents alkylant (temozolomide, procarbazine), les antimétabolites et les sels de platines. Ceci tiendrait au fait qu'en situation normale les dommages chimio-induits de ces agents sur l'ADN serait reconnus par le système MMR qui après plusieurs cycles de réparations inefficaces, déclencherait l'apoptose. Dans les cellules tumorales MSI+, Le système MMR est incapable de reconnaître les dommages chimioinduits sur l'ADN, ce qui conduit à l'absence d'apoptose. [247]

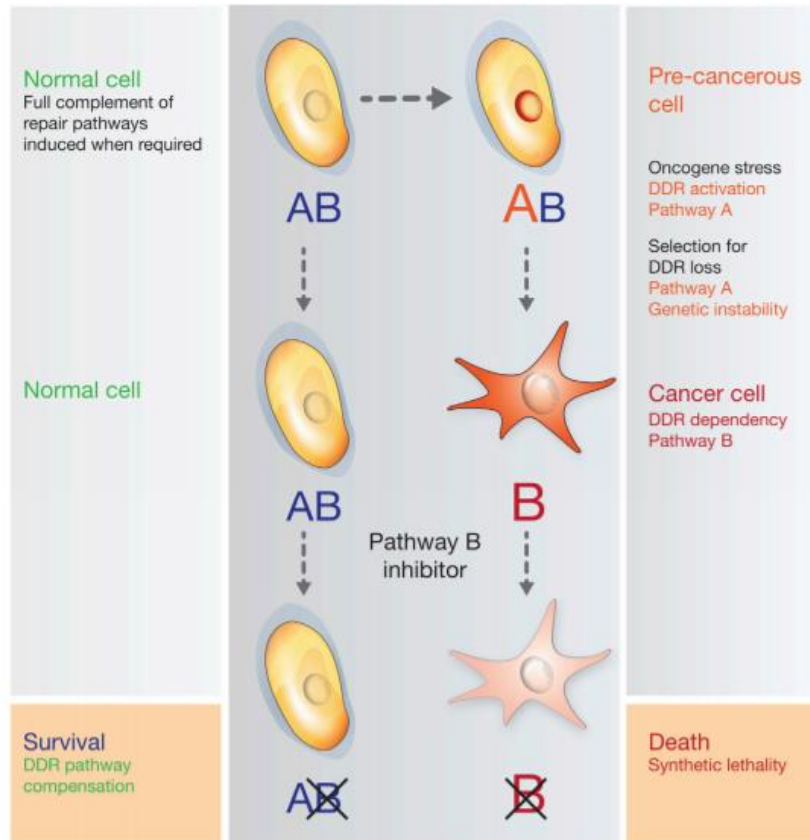
## 2. Rationnel du ciblage de la DDR dans la cellule tumorale

Bien que la DDR joue un rôle dans une partie des résistances aux agents cytotoxiques, cela ne suffit pas à la rendre une cible préférentielle dans le cadre du développement des TC. En réalité, la DDR représente une source de cibles très intéressantes par 3 aspects majeurs qui diffèrent entre les cellules normales et tumorales.

### a. La perte d'une ou plusieurs voies de la DDR

Le premier aspect est que toutes les cellules tumorales auront perdu tôt ou tard un ou plusieurs mécanismes de la DDR. [248]. Une des étapes précoces de la tumorigenèse est la dérégulation de la prolifération cellulaire résultant souvent d'un stress oncogénique (gène « driver ») [1]. Alors que dans les cellules normales, la DDR va constituer une barrière de protection contre cette croissance incontrôlée, l'altération constitutive de cette barrière dans les cellules tumorales entraîne le maintien de ce stress oncogénique, une instabilité génomique et surtout une plus grande dépendance aux mécanismes de la DDR fonctionnels restants pour faire face aux dommages endogènes et exogènes. Ainsi une cellule cancéreuse renfermant une déficience de la DDR devient ultra-dépendante d'une voie alternative pour sa survie. Les acteurs de cette voie « de repli » constituent des cibles prioritaires. C'est sur cette observation qu'a été fondée la stratégie de la léthalité synthétique. [249,250]

Dans le contexte d'une mutation génétique d'une voie de réparation de l'ADN, exclusif de la cellule tumorale, la stratégie de léthalité synthétique repose sur le ciblage thérapeutique d'un second mécanisme de réparation par lequel la cellule cancéreuse est devenue addictive pour sa survie. Le ciblage de cette voie est « synthétiquement létale » pour la cellule tumorale mais épargne les cellules normales dépourvues de mutations. [249-251] (Figure 30)



**FIGURE 30 :** Mécanisme de léthalité synthétique : La perte fonctionnel des voies de la DDR pendant la transformation tumorale résulte d’une dépendance pouvant être inhibé spécifiquement par ciblage thérapeutique. [250]

C’est sur le concept de léthalité synthétique que repose la commercialisation en 2015 de l’olaparib (Lynparza), le premier inhibiteur de la protéine PARP que nous développerons dans la section suivante (II.D). Pour utiliser cette stratégie, il est indispensable de comprendre le contexte génétique du type de cancer ciblé. Par principe, ce ciblage sélectif offre un avantage significatif pour le patient par rapport aux approches des chimiothérapies conventionnelles [249-251].

## b. L'augmentation du niveau d'agression endogène de l'ADN

Une conséquence directe de cette altération systématique de l'une ou plusieurs voies de la DDR est une augmentation des facteurs agressifs endogènes de l'ADN par des réactions en chaînes, conduisant à un état cellulaire d'instabilité génomique. Cette instabilité s'appuie sur une ou plusieurs lésions chromosomiques, des modifications de la séquence (substitutions, délétions, additions) ou de la structure (par cassures) de gènes clés ou « drivers » doublées de l'incapacité de la cellule à réparer ses dommages. Du fait de leurs rôles dans la coordination entre la réplication, la réparation, la régulation du cycle cellulaire, et la mort cellulaire programmée, de nombreux acteurs de la DDR font parties de ces gènes « drivers » (également oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs). Dans la cellule tumorale l'altération de l'un ou plusieurs de ces acteurs implique une défection des mécanismes de réparation cellulaire, entraînant l'accumulation de mutations et du fait d'une dérégulation du cycle cellulaire une entrée en mitose avec un ADN muté responsable de la survenue du cancer et de sa progression. [173,252]

## c. Une augmentation du niveau des stress réplicatifs

Le deuxième aspect repose sur l'exploitation thérapeutique du niveau élevé des stress réplicatifs caractéristiques des cellules tumorales. [253,254]. Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce phénomène :

- Une déplétion du pool de nucléotides nécessaires à la réplication
- Une altération du checkpoint du cycle cellulaire G1/S résultant de mutation de protéines CdK D (cyclin-dependent kinase), de surexpression des Cyclines E, d'un déficit de pRB (protéine du rétinoblastome qui contrôle le point de passage de G0 à G1), etc. [255]
- L'inactivation du checkpoint G1/S entraîne l'entrée prématurée de la cellule en phase S
- Le début de la réplication avec un déficit du matériel réplicatif

- Une surexpression du produit des oncogènes mutés MYC et/ou KRAS qui stimule le recrutement des séquences ORI (séquences d'initiation) et augmente la production des ROS. [256]

Ces dommages de l'ADN font appels à la voie ATR-Chk1 de la DDR et une activation du mécanisme de la RH comme il a été vu précédemment. Au cours d'un traitement par chimiothérapie, le stress réplcatif de la cellule tumorale s'accroît par [195,197,198] :

- Cassures simples et doubles brin d'ADN direct par radiothérapie
- Déplétions supplémentaires du pool de nucléotides par inhibition de leur synthèse par les antimétabolites (gemcitabine et 5-FU)
- Productions de ponts intra et inter-brin, et une augmentation importante des ROS par déplétion du glutathion sous sels de platines
- Blocages de la fourchette de réplication par l'irinotécan et le topotécan qui entraîne un découplage de l'ADN polymérase de de l'hélicase.

Les facteurs de stress réplcatifs intrinsèques expliquent les raisons pour lesquelles les cellules tumorales sont plus sensibles aux stress réplcatifs chimio-induits que chez les cellules saines. Malgré cela, la chimiothérapie garde un index thérapeutique étroit qui engendre une toxicité dose-limitante particulièrement importante dans les tissus à potentiel prolifératif élevé comme les cellules hématopoïétiques, de la muqueuse gastrique et folliculaire du cheveu.

La stratégie thérapeutique repose donc sur le ciblage de la DDR spécifique du stress réplcatif dans la cellule tumorale pour :

- Accroître le niveau de stress réplcatif jusqu'à atteindre un niveau léthale
- Sauvegarder les cellules saines moins sensibles à ce ciblage

Ainsi l'étude détaillé de la voie ATR a permis de cibler 4 acteurs permettant d'exploiter le niveau élevé de stress réplcatif dans les cellules tumorales [255,257] :

- ATR lui-même, protéine centrale de la DDR qui coordonne la réplication, la réparation, le cycle cellulaire et le métabolisme des nucléotides.
- Son effecteur direct Chk1 responsable du checkpoint G2/S du cycle cellulaire
- Les Cyclines-dépendantes kinases (Cdk 1et 2) responsable du checkpoint G2/M et dans l'initiation de la réplication

- La protéine WEE1 antagoniste des CdK

La 1<sup>ère</sup> cible fera l'objet de l'étude de la section III.

La combinaison de ces 3 facteurs fait apparaître une singularité de la cellule tumorale ce qui rend la DDR une cible très pertinente dans le cadre des stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses. (Figure 31)



**FIGURE 31** : Les 3 points clés qui justifient le ciblage de la DDR [250]



### 3. Applications

#### a. L'olaparib, le premier inhibiteur de la protéine PARP

En 1994, le séquençage de l'ADN des cellules tumorales du cancer du sein et de l'ovaire [258] a mis en évidence plusieurs mutations des gènes BRCA 1 / 2 avec une fréquence extrêmement variable en fonction des sous-groupes de populations. Dans la population porteuse de ces mutations, le risque de développer un cancer de l'ovaire est de 40% (gBRCA1) et de 15% (gBRCA2) tandis que celui du sein atteint les 65% (gBRCA1) et 47% (gBRCA2) [259].

Selon l'étude [260], il existe une spécificité tissulaire dans la survenue du cancer lié à ces mutations reposant sur le contrôle qu'exerce les œstrogènes sur la survie des cellules déficientes BRCA 1 / 2. En situation normale, lorsque le niveau des ROS augmente, les protéines BRCA 1 / 2 interagissent avec le facteur de transcription NRFA2 qui active le métabolisme anti-oxydant. La perte fonctionnelle de BRCA 1 / 2 dans les cellules épithéliales mammaires et ovariennes entraîne une accumulation des ROS, mais qui est compensée par l'activation du facteur NRFA2 par les œstrogènes ce qui maintient les cellules mutées en vie.

Les protéines BRCA1 / 2 sont des acteurs primordiaux dans l'initiation et la transduction du système de réparation RH en réponse aux CDB et aux stress réplcatifs et dans l'activation du checkpoint cellulaire G2/S comme il été détaillé dans la section II.3.b.ii. Les mutations des gènes BRCA1 / 2 aboutissent à la formation de produits géniques inefficaces. La mise ne place du système de réparation RH devient impossible entraînant l'accroissement des agressions endogènes de l'ADN, l'augmentation et la persistance des stress réplcatifs et finalement à l'instabilité génomique précédemment décrit en II.C.2. De ce fait, la cellule pré-tumorale devient largement dépendante des autres voies de réparation de l'ADN et tout particulièrement du système de réparation BER dont l'un de ces acteurs centraux est la protéine PARP-1.

La protéine PARP-1 a initialement été décrite comme capteur des CSB de l'ADN faisant suite à une modification chimique d'une ou plusieurs bases azotées. Elle permet le recrutement de nombreux transducteurs dont le facteur XRCC1 et les ADN polymérases. Pour ce faire, elle fixe

la cible et réalise la polymérisation d'une chaîne de résidus ADP-ribose sur la chromatine et /ou sur les protéines cibles selon la réaction suivante [222,223] :



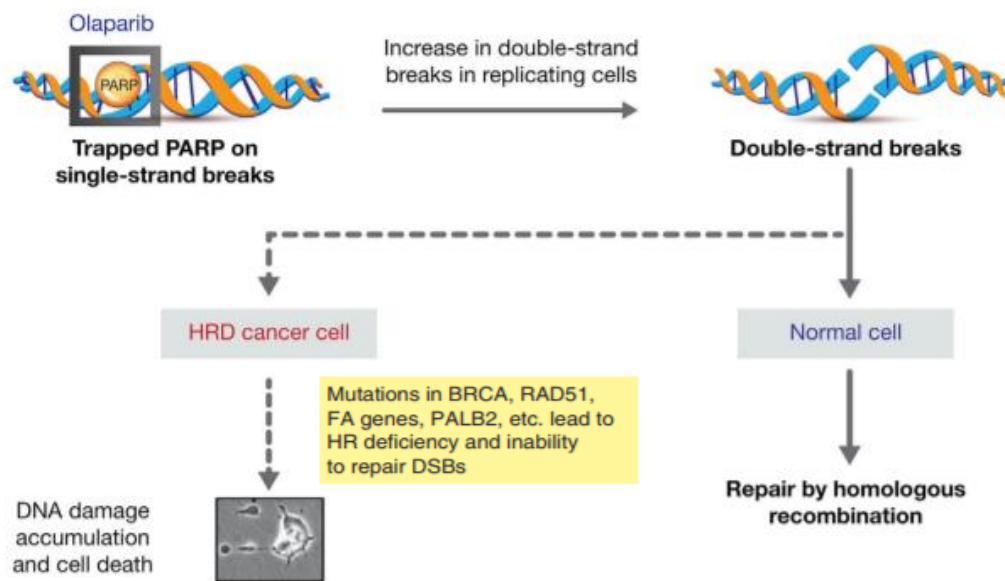
Une fois la chaîne d'ADP-ribose synthétisée, la protéine PARP-1 change de conformation et se libère du site de réparation.

Ainsi, ce phénomène d'ultra-dépendance du système BER et de la protéine PARP-1 pour la survie des cellules déficiente BRCA 1 et 2 est exploité dans le cadre d'une stratégie thérapeutique de létalité synthétique décrite dans la section II.C.2.a

En 2015, le laboratoire Astra Zeneca commercialise l'olaparib (Lymparza®), un inhibiteur compétitif du NAD<sup>+</sup> sur les protéines PARP-1, 2 et 3 empêchant la polymérisation des résidus ADP-ribose et la réparation des CSB via le système BER. [250] Il en résulte :

- Le blocage de PARP-1 qui reste piégé sur le site des CSB. Du fait de l'absence de changement de sa conformation, PARP-1 est incapable de quitter l'ADN. Ce complexe bloque la fourchette de réplication entraînant la mort cellulaire.
- La persistance sur l'ADN des CSB à l'état de lésions. Pendant la phase S, la réplication de l'ADN transforme les CSB non-réparées en CDB létales (lesquelles sont réparées en temps normal par le système RH.)

Devant l'inhibition de PARP-1, les mécanismes de réparations restant ne sont plus en mesure de prendre en charge les dommages de l'ADN. L'olaparib est responsable de la létalité synthétique de la cellule. (Figure 32)



**FIGURE 32 :** Application de stratégie de léthalité synthétique chez les cellules déficientes BRCA 1 / 2 par l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine PARP-1 [250]

Parallèlement au succès clinique de l'olaparib, 4 inhibiteurs de la protéine PARP sont en court d'évaluation dans de nombreux essais cliniques à la fois en monothérapie et en association avec des agents endommageant l'ADN. Il s'agit du veliparib, niraparib, rucaparib, et talazoparib. Ils diffèrent par la biodisponibilité, l'affinité sur le domaine de fixation du NAD<sup>+</sup> et la capacité de pouvoir piéger PARP sur l'ADN. De récentes études montrent que les variations des pouvoirs cytotoxiques des inhibiteurs PARP seraient plus corrélés au blocage de PARP sur l'ADN qu'aux multiplications des CDB. [262,263]

## b. La combinaison des inhibiteurs de la DDR avec les agents anticancéreux

### i) La chimiothérapie [261]

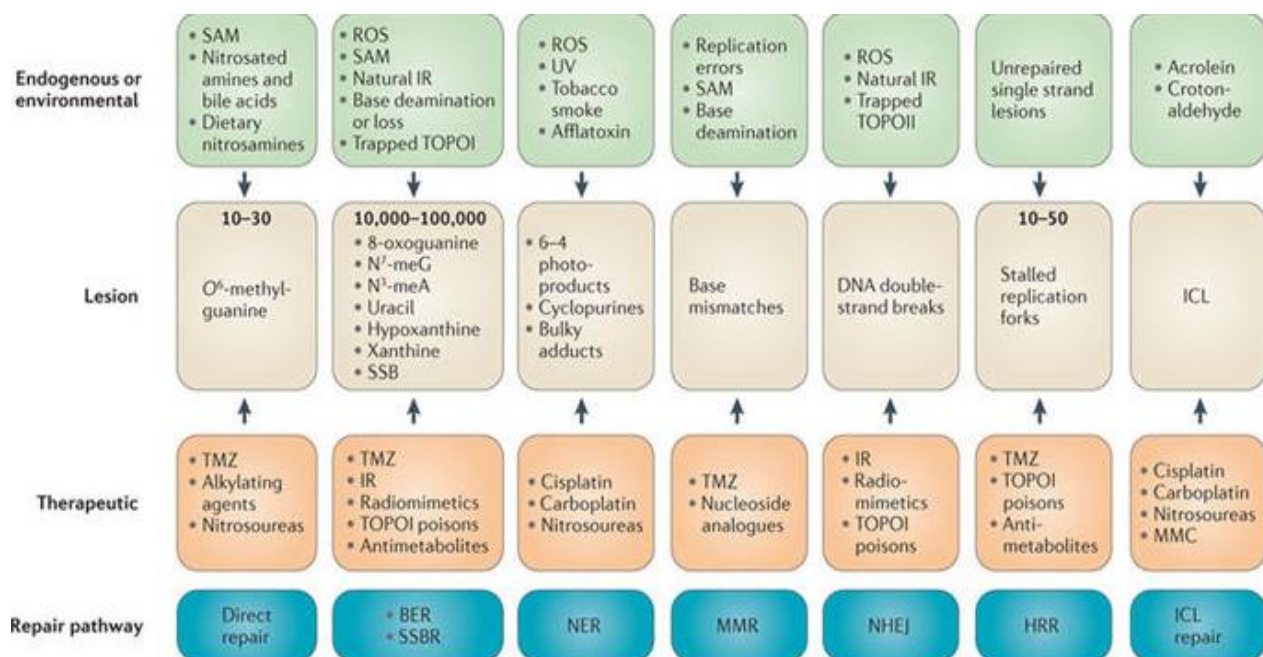
La chimiothérapie anticancéreuse reste le standard thérapeutique de nombreux types de cancers aux stades précoces en situation néoadjuvante, adjuvante ou concomitante à la

radiothérapie. À l'ère de l'optimisation des schémas thérapeutiques, la combinaison de la chimiothérapie avec les TC s'inscrit dans 2 types d'interactions pharmacologiques :

- La synergie additive, lorsque la combinaison des deux types d'agents développe une activité antitumorale supérieure à l'addition des activités antitumorales des deux agents administrés séparément pour une même dose.
- La synergie potentialisatrice ou sensibilisation lorsque la TC possède une faible activité antitumorale, mais augmente significativement celle de l'agent cytotoxique.

Dans ces deux situations, la combinaison permet, de manière variable, de diminuer l'exposition de l'agent cytotoxique aux cellules saines. Cependant l'association peut s'avérer périlleuse, lorsque les toxicités se potentialisent ou s'additionnent. De nombreux essais cliniques évaluant la combinaison des deux types d'agents ont dû s'arrêter du fait d'une toxicité trop importante notamment au niveau médullaire et intestinale. [264]

Dans le cas du ciblage de la DDR, le choix de la TC doit s'aligner sur le mécanisme de réparation sollicité par le dommage chimioinduit de l'agent cytotoxique. Curtin et al. [249] a formulé dans un tableau, ce lien théorique permettant de déterminer le mécanisme de réparation à cibler en fonction de la chimiothérapie choisi.



**TABLEAU 17 :** Lien théorique des mécanismes de réparations sollicités par les dommages de l'ADN chimio-induits.

Devant la lecture de ce tableau, l'ensemble des dommages chimio-induits par le temozolomide, les inhibiteurs de la topo I, les antimétabolites et les radiations sollicitent le mécanisme de réparation BER (dont la protéine PARP-1). De ce fait, ces agents cytotoxiques peuvent constituer une combinaison théoriquement synergique avec les inhibiteurs PARP-1 (PARP-i). Ce lien s'est confirmé au cours de l'essai clinique de la Phase I/II de Middleton et al. [265] évaluant la combinaison temozolomide/veliparib qui a montré une augmentation de la PFS de 3.7 (20mg de veliparib) et 3.6 mois (40mg de veliparib) vs. 1 mois pour le placebo. (NCT00804908) D'autres combinaisons sont en cours d'évaluation autour de 16 essais cliniques, alors que certains essais ont dû être arrêtés prématurément du fait d'une toxicité trop importante. Cependant, il faut préciser, que les doses de chimiothérapies étaient administrées à des dosages standards alors que les concentrations des PARP-i ont été progressivement augmentées ce qui confirme le caractère additif/potentialisateur de l'association.

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour diminuer au maximum les toxicités. L'une d'entre elles, est d'installer des intervalles de temps entre l'administration des deux agents. Dans l'étude d'O'Connor et al. [266], la cisplatine donnée en premier suivi d'un intervalle de 3 jours avant l'administration de l'oliparib permet d'augmenter la survie des promoteurs myéloïdes in vitro par rapport à une administration le même jour. Une autre stratégie suggérée par Weiss et al. [267], est d'associer aux PARP-i, une chimiothérapie bio-guidée sur la cible par des nanoparticules. La formulation CRLX101 développé par [268] a pour objectif de délivrer l'irinotécan directement sur l'endothélium tumoral ce qui limiterait son passage systémique.

## ii) La radiothérapie [269]

La radiothérapie constitue la pierre angulaire du traitement de plus de la moitié des cancers. De grands progrès ont été réalisés ces dernières années afin d'optimiser la radiotoxicité des cellules tumorales tout en protégeant au maximum les cellules saines. Parmi eux, nous pouvons citer la planification des séances et le fractionnement des doses, le positionnement du patient et l'administration des doses guidées par l'imagerie, et enfin l'augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales par l'utilisation concomitante de la chimiothérapie.

[269]

Cependant la toxicité aiguë et les effets secondaires à long terme sont les facteurs limitants pour la délivrance de la dose de rayonnement suffisant pour le contrôle local des tumeurs. Ceci est en partie due à l'utilisation d'agents cytotoxiques non-spécifiques qui sensibilisent à la fois les cellules saines et les cellules tumorales aux radiations. De ce fait, la sélectivité des agents radio-sensibilisants est un paramètre primordial pour concevoir des schémas thérapeutiques efficaces. Le développement des TC et plus spécifiquement celles qui visent la DDR répondent à cette problématique dans le but de rendre les dommages de radio-induits de l'ADN irréparables pour la tumeur tout en diminuant considérablement les effets indésirables.

L'utilisation des inhibiteurs de la DDR, en concomitance avec la radiothérapie, repose sur 3 effets synergiques [269] :

- Au niveau moléculaire, la cytotoxicité des rayonnements ionisants repose sur l'accumulation des CDB de l'ADN létales pour les cellules tumorales. Or inhiber sélectivement les mécanismes de réparation de la cellule tumorale, revient à maximiser les dommages de l'ADN radio-induit. C'est le cas des PARPi qui induisent une augmentation des CDB via un double mécanisme (section II.3.A) particulièrement efficace chez les cellules mutées BRCA 1 / 2 dans le cadre d'un mécanisme de léthalité synthétique.
- Au niveau cellulaire, l'efficacité des rayonnements ionisants repose sur l'accumulation des dommages de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. En effet, les cellules tumorales possèdent un fort pouvoir prolifératif. Or, plus le potentiel prolifératif est important, plus la radiosensibilité est importante. De manière statistique, la proportion de cellules en réplication est plus importante dans la tumeur que dans les tissus sains. Par conséquent, inhiber sélectivement les mécanismes de réparation les plus sollicités pendant la phase S du cycle cellulaire revient d'une part à accroître la radiosensibilité des cellules tumorales tout en diminuant l'exposition des tissus sains aux radiations. C'est le cas des PARPi dans le cadre des cellules tumorales mutées BRCA 1 / 2 déficiente en système de réparation RH qui n'ont plus les moyens de répondre face aux stress réplcatifs et aux CDB de la phase S. [250, 264, 269]

- Au niveau tissulaire, par les potentielles propriétés vasoactives des inhibiteurs de la DDR. En effet l'olaparib et le veliparib, aurait un effet vasodilatateur sur la circulation intra-tumorale ce qui permet d'une part d'améliorer la diffusion des molécules cytotoxiques, et d'autre part de diminuer l'hypoxie au sein de la tumeur qui est un facteur de radiorésistance et de mauvais pronostic pour de nombreux cancers solides. De ce fait, l'utilisation des PARPi dans les tumeurs hypoxiques permet d'améliorer la radiosensibilité de la tumeur. [264, 269]

### c. Apport de l'aspect computationnel dans l'exploration des défauts de la DDR

Dans l'ère de la personnalisation du traitement et de la médecine de précision, caractériser et prédire les effets des rayonnements ionisants sur les cellules saines et tumorales sont des objectifs très pertinents. A ce titre, la modélisation mathématique des systèmes biologiques est devenue au fil des années incontournable. Dans le cadre du traitement par radiothérapie, le modèle mathématique largement utilisé en clinique repose sur une formule linéaire-quadratique qui permet d'estimer la probabilité de survie des cellules après irradiation. La formule définit la survie  $S$  en fonction de la dose  $D$  de rayonnement reçu, et de deux paramètres d'ajustement empirique  $\alpha$  et  $\beta$  [270] :

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

A partir du modèle, le calcul de plusieurs paramètres permet de déterminer la radiosensibilité du tissu traité (dont le paramètre SF2 pour Fraction Survivante à 2 Gray). Cependant, le modèle linéaire-quadratique est mal adapté pour expliquer les raisons sous-jacentes aux réponses variables d'un cancer exposé aux radiations.

En effet, la radiosensibilité d'un cancer n'est pas homogène au sein d'un individu du fait d'une poly-clonalité intra-tumorale. Cette hétérogénéité se reflète dans la diversité des réponses de la tumeur aux radiations et aux TC résultant d'un équilibre entre clones sensibles et agressifs. Pour appréhender cette diversité des réponses cliniques, R.J Flassig et al. [271] suggèrent d'explorer la réponse aux dommages à l'échelle cellulaire. Ils proposent d'intégrer les paramètres déterminants la DDR sollicités par l'exposition aux radiations, dans un modèle mathématique appelé « modèle de réponse ». Dans un second temps, il s'agit d'assimiler ce modèle de réponse à un modèle de survie comme celui cité au-dessus. Ainsi, les prédictions de survies cellulaires dépendront des paramètres de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR).

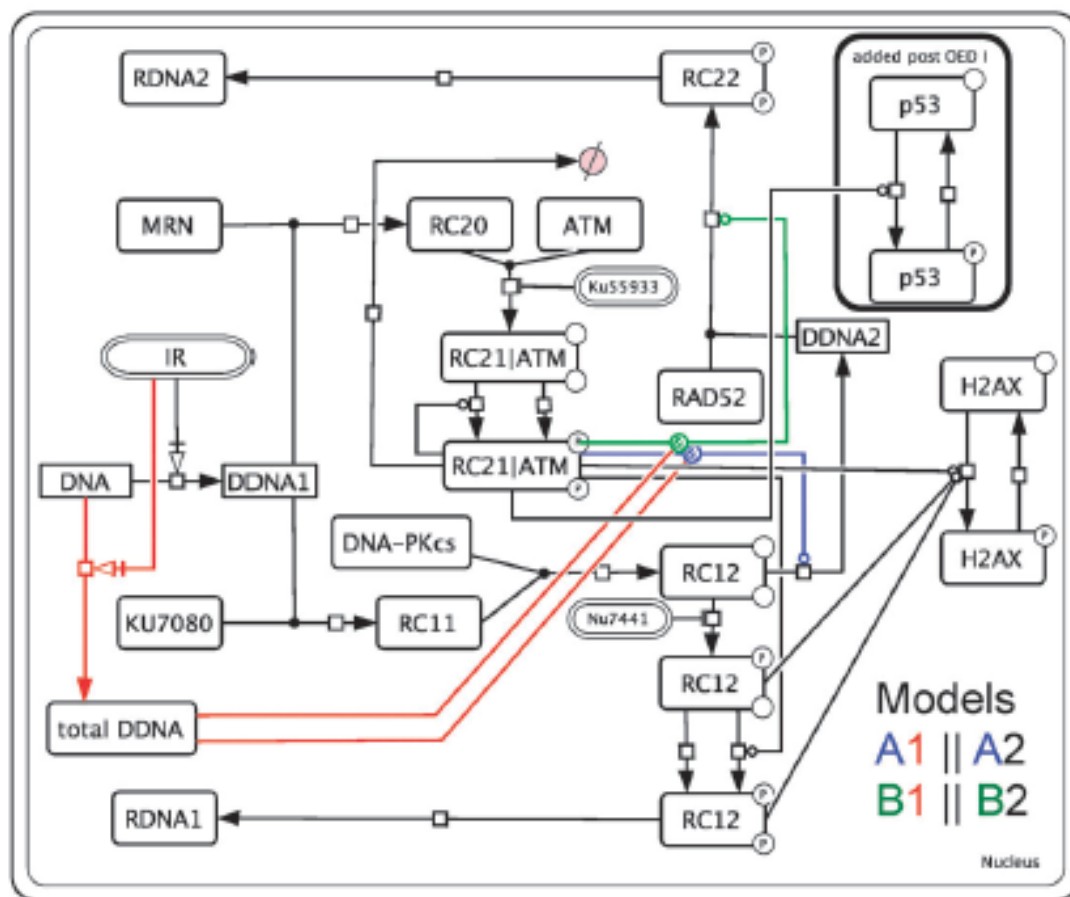
Le modèle de réponse repose sur l'analyse de la contribution dynamique de l'ATM et de la DNA-PK dans la phosphorylation des histones H2AX, étape initiale de la détection des CDB dans l'ADN. Voici la méthode utilisée :



i) Constriction du modèle mécanistique de la DDR [271]

Les auteurs ont construit un modèle mécanistique du réseau de signalisation reflétant la réponse aux CDB de l'ADN (étant les plus délétères) avec 4 voies effectrices (Figure 33) :

- Les voies A et B en fonction de la localisation de la voie catalytique d'ATM
- Les indices 1 et 2 en fonction de la cinétique du mécanisme de réparation (rapide pour le système NHEJ, et lente pour le système RH et MMEJ)



**FIGURE 33 :** Modèle du réseau des voies de signalisations de la DDR. À la suite d'une simulation d'exposition aux radiations, le modèle s'active autour de 4 voies : A1, B1 (voie rouge, réparation fidèle du système NHEJ, cinétique rapide) et A2, B2 (voie noire, réparation infidèle du système NHEJ, activation des systèmes RH/MMEJ, cinétique lente). Les rectangles représentent des états de transitions. La probabilité de passage d'un état de transition vers un autre suit une loi normale  $p \sim N(0; 1)$ .

**Abbreviations:** IR ionizing irradiation; DDNA1 initial, damaged DNA; RC11 Ku70/80 to DDNA1 association; RC12 Ku70/80-DNA-PKcs complex; RDNA1/2 repaired DNA (cNHEJ / aNHEJ or HR); RC20 MRN complex to DDNA1 association; RC21|ATM MRN-ATM complex at damage site; RC22 RAD52 mediated repair complex; DDNA2, unsuccessful cNHEJ repair moved to aNHEJ/HR

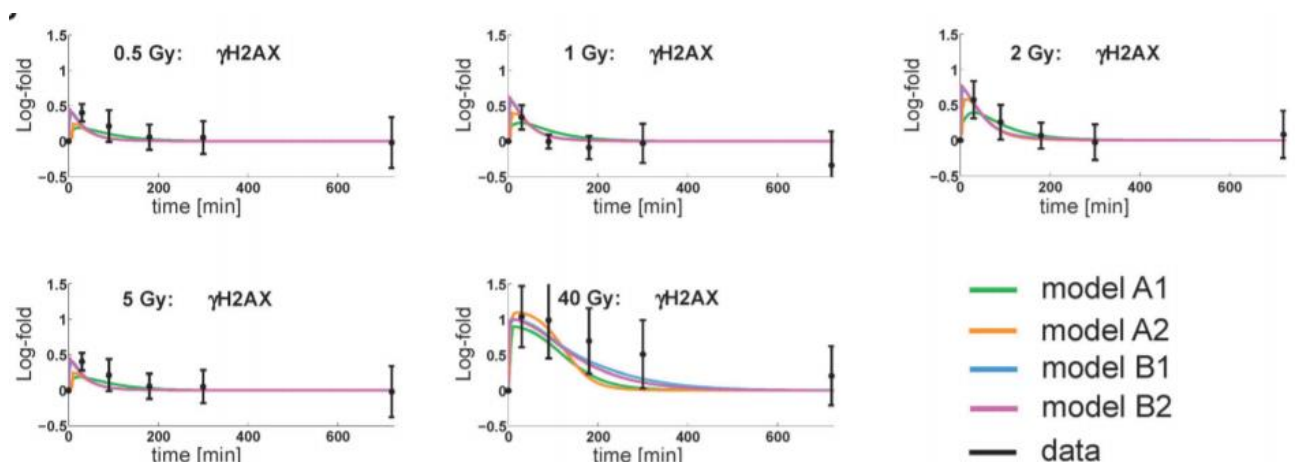
Si les dommages sont réparés fidèlement par le système NHEJ, la totalité de l'ADN est engagée dans la réparation qui suivra la cinétique rapide (1). Si la réparation est infidèlement réparée par le système NHEJ, une partie de l'ADN (DDNA2) sera prise en charge par les mécanismes MMEJ et RH et suivra la cinétique lente (2). Ainsi les voies effectrices de réparation du modèle sont soit A1, B1, A2 ou B2.

## ii) Calibration du modèle à l'aide d'expérience in vivo [271]

Une fois les probabilités de passage entre les états de transition identifiés grâce à la littérature, le modèle est calibré à partir d'expérimentations in vivo (sur des cellules MDCK) afin d'obtenir une « variation de  $\gamma$ H2AX en fonction du temps » de référence. Les résultats de ces expériences ne seront pas développés notre analyse.

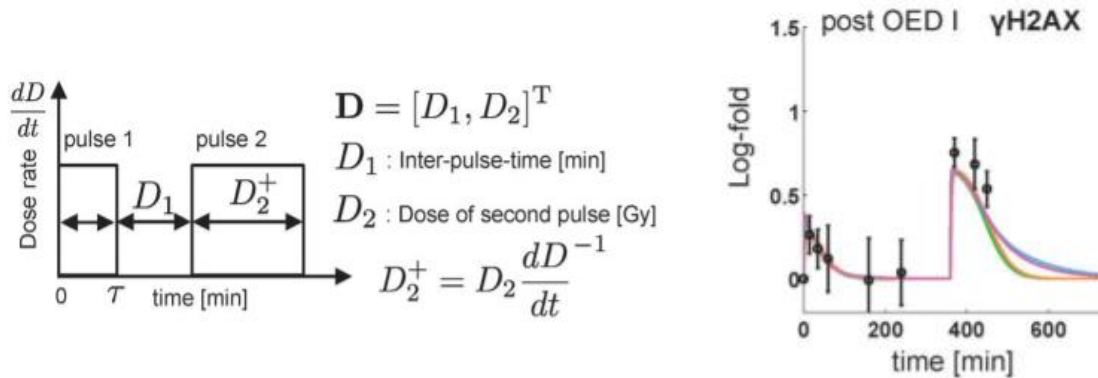
Puis le modèle est testé au moyen de trois simulations ou OED (optimal experimental design) avec le même protocole de dosage que celui utilisé in vivo :

- La simulation OED-0 repose sur l'administration de 5 doses croissantes : 0.5, 1, 2, 5, et 40 Gy (GRAY). Le système est remis à l'état initial après chaque dose. La stimulation du modèle par irradiation virtuel déclenche la formation des  $\gamma$ H2AX via les 4 voies effectrices. Ces réponses virtuelles sont comparées aux réponses in vivo (courbe data) (Figure 34)



**FIGURE 34.** Simulation OED-0 : enregistrement des variations des  $\gamma$ H2AX au cours de temps pour 5 régimes de dose

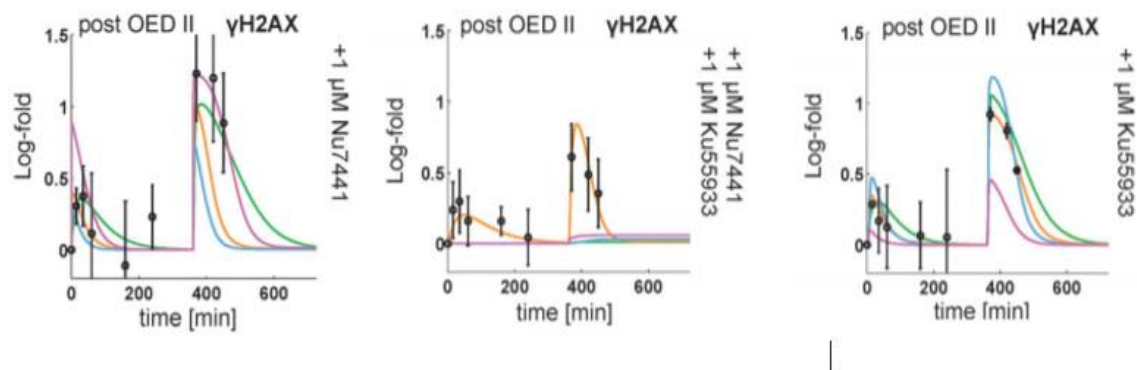
- La simulation OED-1 repose sur un schéma d'irradiation à double impulsion selon la figure 35. La 1<sup>ère</sup> impulsion est de 1 Gray suivi 6h plus tard ( $D_1$ ) d'une 2<sup>ème</sup> impulsion de 20 Gray ( $D_2$ ). La formation des histones  $\gamma$ H2AX est biphasique conformément au schéma d'irradiation.



**FIGURE 35.** Simulation OED-1 : enregistrement de la variation des  $\gamma$ H2AX au cours de temps

Dans les deux types de simulations, toutes les courbes se confondent. De ce fait, il est impossible de distinguer les différentes voies effectrices et les contributions respectives d'ATM et de DNA-PK dans l'initiation de la réparation de l'ADN.

- De ce fait, la simulation ODE-2 reprend le même schéma d'irradiation que dans la simulation ODE1, mais utilise en plus deux inhibiteurs kinases sélectifs Nu7441 et Ku55933 de DNA-PK et d'ATM respectivement. Les drogues sont administrées 30 min avant la 1<sup>ère</sup> impulsion selon trois modes : Nu7441 seul, Nu7441/Ku55933 combiné, Ku55933 seul à la concentration de 1  $\mu$ Molaire (Figure 36)



**FIGURE 36** : Simulation OED-2 : enregistrements des variations des  $\gamma$ H2AX au cours de temps. Nous remarquons que lorsque les 2 inhibiteurs sont ajoutés simultanément, une voie effectrice initiant la réparation persiste (A2). Il s'agit d'un modèle qui ne correspond pas à une réponse physiologique réelle.

Les équations différentielles des 3 simulations (ODE) et l'estimation des paramètres par minimisation itérative de la fonction critère ne seront pas détaillés.

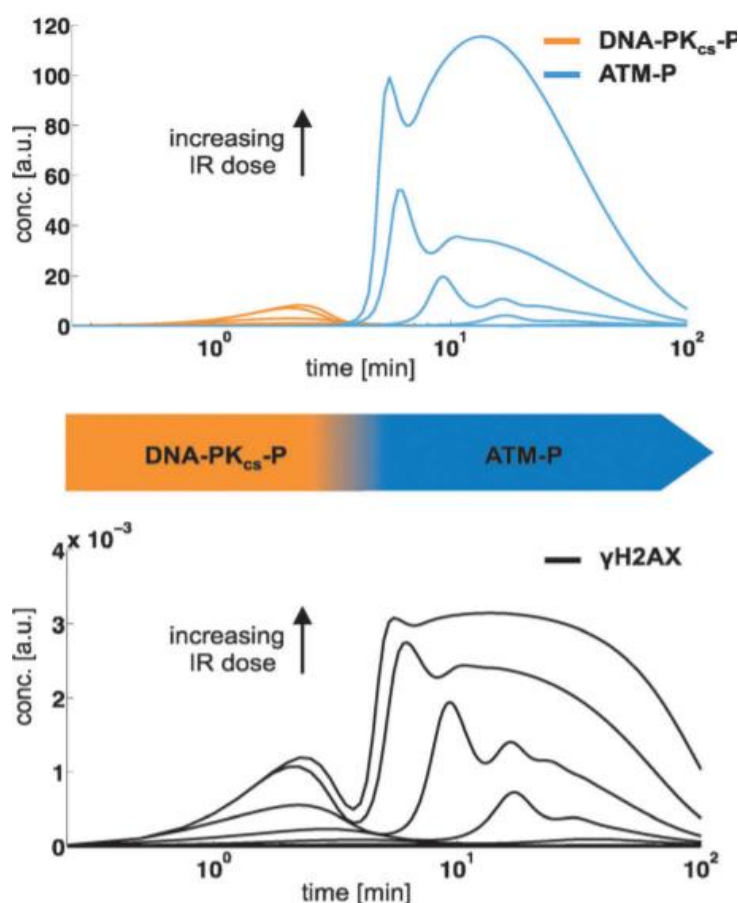
### iii) Evaluation de la contribution d'ATM et de la DNA-PK dans la phosphorylation des histones H2AX. [271]

#### ➤ Modélisation de la réponse aux radiations dans la cellule saine.

Une fois le modèle calibré, il est testé au moyen de 4 simulations ; chacune d'entre elle est décrite par une impulsion de 4 doses différentes variant de 1 à 100 Grays (Figure 37)

Selon les prédictions du modèle, la phosphorylation de  $\gamma$ H2AX est biphasique indépendamment de la dose, suivant une première phase rapide et de faible amplitude initiée par DNA-PK, et une deuxième phase plus lente et de grande amplitude en fonction de la dose associée à ATM.

Dans les 4 simulations, la DNA-PK s'active rapidement dans les 2 à 10 premières minutes puis s'atténue à partir d'un temps  $t$  qui apparaît relativement homogène en fonction de la dose. Cette atténuation suit l'activation soudaine et prolongée d'ATM qui semble prendre le relais pour l'initiation de la réparation comme en témoigne les deuxièmes pics des  $\gamma$ H2AX.



**FIGURE 37.** La variation des concentrations de DNA-PK et d'ATM au cours de temps suit celles des histones  $\gamma$ H2AX.

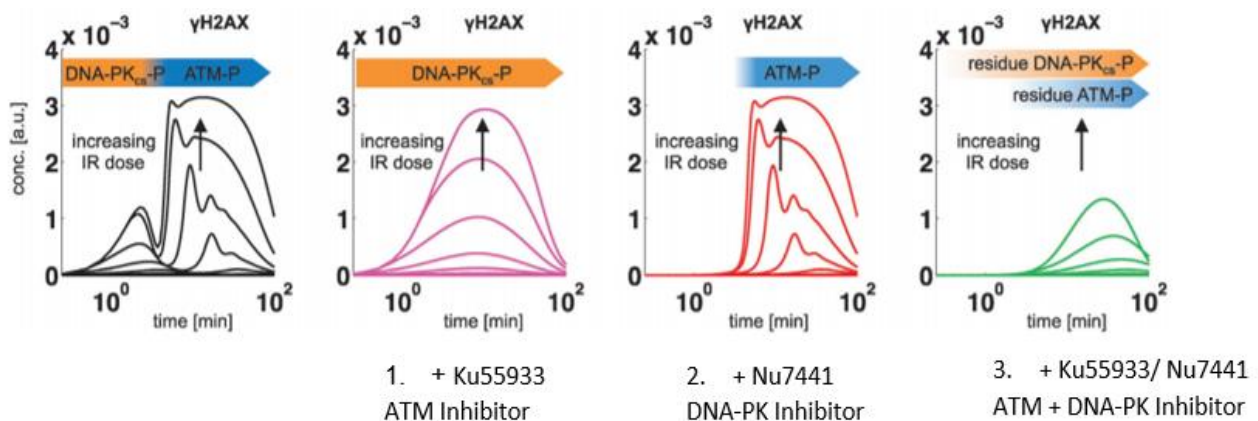
Cette coordination de la prise en charge successive des CDB radio-induites par DNA-PK puis ATM sont en concordance avec la littérature [272]. En effet, la réponse physiologique cellulaire aux CDB commence par une prise en charge rapide et brève de DNA-PK puis, une activation lente et prolongée de la voie ATM amplifiée par des phénomènes d'autophosphorylation expliquant la forte augmentation des  $\gamma$ H2AX particulièrement pendant

la phase G1 du cycle cellulaire. Cette concordance rend le modèle construit fidèle à la physiologie cellulaire.

Cependant, cette coordination des mécanismes de réparation peut être altérée au sein de la cellule tumorale comme nous l'avons décrit plus haut (section II.C.2a). Ceci du fait de mutations aléatoires, sur les gènes codants pour les acteurs de ces systèmes. C'est le cas des cellules tumorales du cancer du sein et de l'ovaire mutées BRCA 1 / 2 qui sont dans l'incapacité d'initier le système de RH. De ce fait, les auteurs ont voulu simuler grâce à leur modèle, la réponse cellulaire aux radiations dans les conditions tumorales c'est-à-dire lorsque l'initiation de la réparation par DNA-PK ou ATM est défectueuse.

### ➤ Modélisation de la réponse aux radiations dans la cellule mutée

Ainsi, la simulation reprend le même protocole d'irradiation que précédemment (1 impulsion de 4 doses différentes entre 1 et 100 Grays), mais elle utilise en plus deux inhibiteurs kinases sélectifs de DNA-PK et d'ATM selon 3 modes. La variation des  $\gamma$ H2AX au cours de temps est enregistrée. (Figure 38)



**FIGURE 38 :** Enregistrements des variations des  $\gamma$ H2AX au cours de temps par exposition de doses croissantes. Simulations d'inhibitions d'ATM et de DNA-PK selon 3 modes

Dans la première simulation, aucun inhibiteur n'est administré. On retrouve donc la coordination entre DNA-PK rapide et brève et d'ATM lente et prolongée dans le temps comme vue précédemment.

Dans la deuxième simulation, les auteurs simulent l'administration d'un inhibiteur sélectif d'ATM avant l'irradiation. De ce fait, seul DNA-PK peut-être à l'origine de la phosphorylation des H2AX. Il est alors intéressant de voir que l'augmentation des  $\gamma$ H2AX s'effectue malgré tout de la manière qu'en situation normale, c'est-à-dire lorsqu'ATM n'est pas inhibé. La cinétique des  $\gamma$ H2AX est à la fois rapide et prolongée dans le temps mais également avec la même amplitude qu'ATM. Ceci témoigne donc d'un phénomène de compensation de DNA-PK lorsque ATM est inhibé. En effet, DNA-PK conserve son activation rapide mais compense l'absence de coordination avec ATM par une activité plus longue et proportionnelle à la dose et donc aux dommages radio-induits.

Dans la troisième simulation, nous observons que ce phénomène de compensation n'est pas réciproque. En effet, lors de l'administration d'un inhibiteur sélectif de DNA-PK, il n'y a aucune augmentation des  $\gamma$ H2AX les premières dizaines de minutes suivant l'irradiation. On retrouve une augmentation lente et prolongée des  $\gamma$ H2AX initiée par l'activation d'ATM.

Dans la quatrième simulation, les deux inhibiteurs sont administrés avant l'irradiation. On observe une réponse résiduelle tardive.

Le phénomène de compensation de DNA-PK en l'absence d'ATM généré par le modèle doit faire l'objet de d'explorations plus approfondies pour pouvoir émettre des hypothèses cliniques. S'il s'avère que cette compensation s'exprime sous une forme d'une dépendance pour la voie DNA-PK de la cellule tumorale au phénotype ATM déficient concernant la réparation des CDB radio-induites, on peut imaginer, qu'un ciblage de la voie DNA-PK serait pertinent.

Finalement, l'utilisation de modèles mathématiques peut être un outil permettant d'explorer le comportement de la DDR dans différentes situations délétères ou mutationnelles de la cellule, soumise à un traitement. De plus, l'intégration de ce genre de modèle dans un modèle de survie permettra de délivrer une dose de radiations optimale et localisée sur les sous-clones aux phénotypes radiosensibles seulement.

#### d. Rationnel du ciblage de la voie ATR-Chk1

Comme nous l'avons vu précédemment (section II.B.2b), ATR est un acteur central de la DDR, indispensable dans la progression de la réplication par son rôle protecteur contre les stress réplcatifs intrinsèques à la phase S. Il coordonne la réplication avec la réparation de l'ADN tout en régulant le cycle cellulaire via son effecteur Chk1 en 2 points : entre les phases S/G2 et G2/M entraînant l'inhibition de l'entrée la cellule en mitose le temps de la réparation. De plus, lorsque les dommages sont trop importants, ATR participe à l'induction de l'apoptose via son effecteur Bid. [204, 212-215]

Des études ont démontré que la délétion homozygote d'ATR ou de CHK1 conduit à une léthalité embryonnaire pré-implantatoire, et aucun humain vivant n'a été identifié comme complètement dépourvu de fonction ATR ou CHK1. Tous ces éléments font d'ATR un acteur crucial pour le maintien de l'intégrité de la cellule eucaryote. [212,213]

Cependant, dans le cadre du chaos génomique régnant au sein de la cellule tumorale, il existe une dérégulation caractéristique de la DDR ayant pour point commun d'entraîner un avantage prolifératif. Cet avantage prolifératif fait intervenir la protéine ATR en 3 points :

- 1- Le phénotype de la cellule tumorale repose sur un déséquilibre entre signaux oncogéniques et antiprolifératifs au niveau du cycle cellulaire. Très souvent il s'agit de la mutation du gène suppresseur de tumeur p53 (effecteur de la protéine ATM) et/ou d'un déséquilibre dans les cyclines, et leur kinases cycline-dépendantes (CDK) et leurs inhibiteurs [173,262,273] associé à la suractivation des oncogènes type Myc et RAS [256]. La combinaison de ces facteurs aboutit à la perte du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire. De ce fait, les cellules tumorales sont beaucoup plus susceptibles d'entrer en phase S avec une probabilité de stress réplcatifs accrus, et une augmentation des CDB associées à la réplication [274]. Elles ont donc tendance à être beaucoup plus dépendantes que les cellules normales au point de contrôle S/G2 pour s'assurer que ces dommages ne sont pas transmis aux cellules filles. Par conséquent, inhiber le point de contrôle S/G2 dans la cellule tumorale, ce qui revient à inhiber la voie la voie ATR / Chk1 qui l'active, apparait être une cible pertinente.



- 2- D'autre part, il est reconnu qu'au sein de la cellule tumorale, l'hypoxie est facteur de résistance à la chimio et radiothérapie. [264, 269, 275] Parallèlement, l'hypoxie cellulaire est à l'origine d'une augmentation du stress réplicatif [276] et donc d'une dépendance particulière à la protéine ATR. De ce fait, cibler la voie ATR / Chk1 peut apparaître comme sensibiliser la cellule tumorale aux agents endommageant l'ADN.
- 3- Enfin, des études in vitro et in vivo ont montré que la cellule tumorale pouvait être déficiente de la voie ATM / Chk2 ce qui les rend beaucoup plus dépendantes de la voie ATR / Chk1 que les cellules normales pour la coordination de la réparation et la régulation du cycle cellulaire [196,204,212]

Ces arguments ont poussé à l'exploration plus approfondie de la voie ATR / Chk1 au travers de plusieurs points :

Les premières études de validation de l'ATR et du CHK1 en tant que cibles anticancéreuses ont été réalisées via des études in vitro par des moyens génétiques. Les études [277-278] ont testé l'inactivation d'ATR par transfection d'un gène ATR mutant ATR-KD (« *dead kinase* »). Cette transfection n'a pas eu d'effets cytotoxiques directes mais a rendu les cellules sensibles à une grande variété d'agents endommageant l'ADN, dont les radiations, les agents alkylants (méthyl-méthane sulfonate, cisplatine), les poisons des Topo I et II (topotécan, SN-38, étoposide, doxorubicine) et les antimétabolites (hydroxyurée). Les études d'inactivation de Chk1 ont été principalement réalisées par l'utilisation des siRNA ou shRNA knockdown de l'expression de CHK1, sensibilisant également les cellules à divers agents endommageant l'ADN : topoisomérases I et II (SN-38, étoposide, doxorubicine), antimétabolites (cytarabine, 5-fluorouracil), gemcitabine) et antibiotiques anticancéreux (lidamycin) [279-282]

De plus, dans certaines études, la régulation négative de l'ATR ou du CHK1 sensibilise significativement plus les cellules déficientes en p53 que les cellules compétentes en p53, ce qui conduit à penser que le ciblage de la voie ATR-Chk1 serait particulièrement efficace dans les cellules présentant une p53 déficiente. Par exemple, la régulation à la baisse de CHK1 et de ATR a sensibilisé les cellules HCT-116 déficientes en p53 aux dommages de l'ADN dans une plus grande mesure que les cellules de type sauvage HCT-116 p53 [196,203,213].

Du fait de la place centrale que tient ATR dans la physiologie cellulaire normale et dans la survie de la cellule tumorale comme en témoigne les expériences in vitro citées plus haut, la recherche scientifique s'est orientée dans le développement d'inhibiteurs sélectifs des protéines ATR et Chk1 comme éventuels potentialisateurs des agents endommageant l'ADN que sont la chimiothérapie et la radiothérapie.

Les premiers agents développés avaient une faible spécificité inhibant à la fois ATR, ATM, DNA-PK, et d'autres protéines de la famille PI3K. Mais ceux développés récemment se sont avérés à la fois plus sélectifs et plus puissants.

#### e. Le développement des inhibiteurs ATR (ATRi)

L'induction nucléaire de la phosphorylation de H2AX strictement ATR-dépendant, (c'est-à-dire indépendant d'ATM ou de DNA-PK), fut un indicateur fiable et efficace pour tester les molécules candidates possédant une activité ATRi. Cependant, le criblage moléculaire des ATRi a été limité du fait que l'activité kinase d'ATR soit spécifique de la phase S et G2 du cycle cellulaire. [283]. Initialement développé en tant qu'inhibiteur de CDK2, NU6027 est le 1<sup>er</sup> agent évalué pour son activité ATRi mais il fut abandonné du fait de sa faible sélectivité. [284]. Par la suite, l'agent inhibiteur ETP-46464 bien plus sélectif que NU6027 a été identifié (ATR IC<sub>50</sub> = 25 nM) [283] mais ses propriétés pharmacocinétiques médiocres ont empêché la poursuite de son développement. Une méthode de criblage plus spécifique, et une modification structurale d'une fonction aminopyrazine d'un composé précurseur, le VE-821 (ATR IC<sub>50</sub> = 26 nM), ont conduit à l'identification du VE-822 (ATR IC<sub>50</sub> = 0,2 nM). La modification structurale du composé précurseur a permis au VE-822 d'augmenter son activité inhibitrice par 100 pour ATR mais également pour ATM et DNA-PK. Cependant sa sélectivité pour ATR sont restés assez élevé pour pouvoir continuer son développement [285]. Les résultats de ses études in vivo et son profil toxicologique favorable ont conduit au lancement du VE-822 (renommé VX-970) en tant que 1<sup>er</sup> agent ATRi à entrer dans les essais cliniques. Plus tard, d'autres ATRi ont été identifiés tel que l'AZ20 (ATR IC<sub>50</sub> = 5 nM) ou encore AZD6738 (ATR IC<sub>50</sub> = 1 nM) (Tableau 18)

ATR Inhibitors			
Name	Structure	IC <sub>50</sub> /Ki	Specificity
NU6027		ATR IC <sub>50</sub> = 1 nM	ATR, CDK1 (Ki = 2.5 μM), CDK2 (Ki = 1.3 μM)
ETP-46464		ATR IC <sub>50</sub> = 25 nM	ATR
VE-821		ATR IC <sub>50</sub> = 26 nM	>100-fold ATR vs. ATM/DNA-PK
VE-822/VX-970		ATR IC <sub>50</sub> = 0.2 nM	>100-fold ATR vs. ATM/DNA-PK
AZ20		ATR IC <sub>50</sub> = 5 nM	>600-fold ATR vs. ATM/DNA-PK/PI-3K
AZD6738		ATR IC <sub>50</sub> = 1 nM	ATR

**TABEAU 18** : Les inhibiteurs sélectifs de la protéine ATR (ATRi) [286]

#### d. Etudes précliniques du VX-970

Les études précliniques in vivo et in vitro, du VX-970 ont majoritairement confirmé un effet chimio-sensibilisant des agents cytotoxiques par un mécanisme qui semble être une amplification des stress réplicatifs et/ou une létalité synthétique lorsque le phénotype est ATM déficient. Cependant, il pourrait également avoir une activité cytotoxique en tant qu'agent unique selon certaines conditions phénotypiques de la cellule tumorale. [287]

i) In vitro

In vitro, le VX-970 a potentialisé jusqu'à 10 fois, l'effet cytotoxique du cisplatine et du carboplatine dans les cellules tumorales du côlon humain mutantes p53 ou déficientes en ATM [81]. Cet effet chimio-sensibilisant au cisplatine s'est confirmé chez des lignées cellulaires de cancer du poumon avec un effet prononcé chez les cellules mutantes p53 [288] mais également sur un panel de lignées cellulaires tumorales ovariennes, endométriales et cervicales.

De même, le VX-970 a démontré une activité synergique significative avec des agents antimétabolites, en particulier la gemcitabine, dans les cellules tumorales du côlon et du poumon avec un effet semblable à celui observé au cisplatine [289]. Le VX-970 potentialise également la cytotoxicité de la camptothécine et d'un poison expérimental de topoisomérase le LMP400 dans les cellules tumorales du côlon et du sein, avec des effets plus marqués sur les phénotypes mutants p53 [290]. Cet synergisme est retrouvé, avec l'étoposide et le SN-38, dans un panel de cellules tumorales du poumon, mais pas autant que celui observé avec la gemcitabine et le cisplatine [288].

L'une des perspectives intéressantes qui fait déjà l'objet d'essais cliniques, est l'association d'un ATRi avec un PARPi. En effet, les PARPi possèdent une activité antitumorale chez les cellules mutées BRCA 1 / 2 déficientes en mécanismes de réparation RH par un mécanisme de létalité synthétiques. Hors l'activation de BRCA et donc la mise en place de la RH dépend majoritairement d'ATR pendant la phase S. Par conséquent, il est prédit que la perte d'ATR par un inhibiteur conduirait à un phénotype BRCA-like sensible à l'inhibition PARP, semblable aux cellules tumorales BRCA mutées. Il a été démontré que les ATRi NU6027 et VE-821 potentialisent l'activité cytotoxique des inhibiteurs de la PARP (rucaparib et véliparib) dans deux lignées cellulaires cancéreuses de type sauvage BRCA [291].

L'étude de Pires et al. [292] a démontré que les ATRi augmentent la cytotoxicité des rayonnements ionisants seul ou en association avec des agents cytotoxiques. Le VX-970 a induit une augmentation significative de la mort cellulaire radio-induite dans une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses, dont le cancer du col de l'utérus, le cancer du sein triple négatif, du côlon, et ORL. L'étude a montré que la radio-sensibilisation en VX-970 a été

observée en conditions hypoxiques, ce qui semble être décisif du fait que les cellules hypoxiques ont tendance à présenter un phénotype agressif souvent résistant à la radiochimiothérapie. [264, 269, 275]

## ii) In vivo

In vivo, le VX-970 potentialise l'activité antitumorale de l'inhibiteur de l'irinotécan, chez des souris porteuses de xénogreffes de cancer du côlon humain [290]. Les souris ont été traitées avec injection intra-péritonéale d'irinotécan au jour 0 d'un cycle de 4 jours et d'une prise orale de VX-970 sur trois jours consécutifs. La combinaison avec le VX-970 a significativement augmenté l'activité cytotoxique de l'irinotécan sans augmenter notablement la toxicité de l'irinotécan. L'ATRi aurait été toléré, sans effets toxiques supplémentaires observés sur l'irinotécan seul [290]. Le VX-970 améliore significativement l'efficacité du cisplatine dans 6 modèles de xénogreffes de tumeurs pulmonaires sur 7 sans augmentation de l'intoxication, (mesurée par perte de poids) par rapport au traitement au cisplatine seul [288]. Dans cette étude, la combinaison a conduit à une inhibition complète de la croissance tumorale dans 3 modèles insensibles au cisplatine et à une régression tumorale dans un modèle sensible au cisplatine persistant pendant trois semaines après l'arrêt du traitement.

Cependant le VX-970 en agent unique, n'a pas déployé d'activité antitumorale sur les mêmes types de modèles in vivo.

# PARTIE III : DÉVELOPPEMENT DU PREMIER INHIBITEUR DE LA PROTÉINE ATR : LE VX-970

Les récentes autorisations de la FDA pour la commercialisation des inhibiteurs PARPi: l'olaparib (Lynparza), le rucaparib (Rubraca) et le niraparib (Zejula) dans le cancer du sein et de l'ovaire mutés BRCA 1 / 2 témoignent de la pertinence et l'intérêt du ciblage de la DDR pour traiter certains cancer. Par ailleurs, les arguments sur lesquelles reposent ce ciblage (section II.C.3.d) et les résultats précliniques développées dans la section précédente démontrent que l'axe ATR-Chk1 est une cible attrayante dans le but d'accroître la radio- et chimio-sensibilité de diverses tumeurs solides, en combinaison avec des agents cytotoxiques ou des TC pertinentes avec une réponse particulièrement marqué chez les phénotypes p53 muté et/ou ATM déficient.

## A. L'ESSAI CLINIQUE DE PHASE I ÉVALUANT LA COMBINAISON VX-970 + GEMCITABINE

En 2012, le laboratoire Vertex Pharmaceuticals reçoit le feu vert pour lancer de développement clinique « *first-in-human* » du VX-970 (récemment acquis par Merck) au cours d'une phase I (NCT02157792) toujours en phase de recrutement. Les résultats préliminaires de cette étude ont fait l'objet d'un poster lors du congrès annuel de l'ASCO de 2016. Nous les présentons ici. [293]

C'est un essai multicentrique, open-label, concernant des patients de 18 ans ou plus, atteint de cancer solide aux stades avancés. Les patients n'ont reçu aucun traitement pour leur cancer dans les 4 semaines avant la date de leur entrée dans l'étude. Les objectifs de cet essai clinique sont :

1. Évaluer l'innocuité et la tolérance du VX-970 selon un schéma de multiple escalade de dose.
2. Déterminer la dose maximale tolérée (DLT) et la pharmacocinétique du VX-970 lorsqu'il est administré en combinaison avec les agents cytotoxiques, puis évaluer la réponse tumorale.
3. Identifier les biomarqueurs d'ADN, d'ARN ou sanguins potentiellement corrélés avec la pharmacocinétique, la pharmacodynamie, les résultats du traitement et/ou les effets indésirables.

L'essai comprend 3 bras :

- Bras A : Comporte des doses croissantes de VX-970 administré par voie IV selon un schéma d'escalade de dose « 3+3 » en association avec la gemcitabine chez les sujets atteints de tumeurs solides selon le planning de doses : gemcitabine j1, j8 + VX-970 j2, j9 sur un cycle de 21 jours.
- Bras B : Comporte des doses croissantes de VX-970 administré par voie IV selon un schéma d'escalade de dose « 3+3 » en association avec la cisplatine chez les sujets atteints de tumeurs solides selon le planning de doses : cisplatine j1 + VX-970 j2, j9 sur un cycle de 21 jours.
- Bras C : Il se divise en 2 sous-bras :
  - C1 : Comporte des doses croissantes de VX-970 administré par voie IV selon un schéma d'escalade de dose « 3+3 » en association avec la gemcitabine chez les sujets atteints de CBNPC avec un phénotype p53 muté et/ou ATM déficient selon le planning de doses cisplatine j1 + VX-970 j2, j9 sur un cycle de 21 jours
  - C2 : Comporte des doses croissantes de VX-970 administré par voie IV selon un schéma d'escalade de dose « 3+3 » en association avec la cisplatine chez les sujets atteints de cancers du sein triple négatifs avec un phénotype BRCA 1 / 2 non muté (*wild type*) selon le planning de doses cisplatine j1 + VX-970 j2, j9 sur un cycle de 21 jours

Les 3 bras comportent une phase de sécurité de démarrage par l'administration de VX-970 en monothérapie.

Les résultats préliminaires présentés lors du congrès annuel de l'ASCO de 2016 concernent le bras A seulement (association VX-970 + gemcitabine). [293]



## **RÉSULTATS :**

Le nombre moyen de cycle réalisé par patient était de 4.

52 patient ont été enrôlés dans le bras A de l'étude. Mais seulement 50 patients ont été traités par la combinaison VX-970 + gemcitabine. Parmi les 50 sujets, 35 ont complétés l'étude, 12 sont sortis de l'étude en cours de route, 3 était toujours dans l'étude.

Au cours des cycles de traitement, 26 patients sur 50 ont fait l'objet d'effets indésirables de grade supérieur ou égale 3 (52%). La DLT se réalisa chez 4 patients, la MTD ne fut jamais atteinte. Parmi les 4 patients ayant fait l'expérience de la DLT :

- 2 patient ont atteint une thrombocytopénie de grade 3 à la dose de 72 mg/m<sup>2</sup> de VX-970 / 875 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabine
- 1 patient a atteint une élévation des transaminases de grade 3 à la dose de 30 mg/m<sup>2</sup> de VX-970 et 500 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabine
- 1 patient a atteint une élévation des transaminases de grade 2 et une élévation des phosphatases alcaline de grade 3 à la dose de 140 mg/m<sup>2</sup> de VX-970 et 500 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabine (Tableau 20)

L'escalade dose de gemcitabine fut arrêter à 1000 mg/m<sup>2</sup> du fait d'une toxicité hématologique cumulative. La dose recommandée de l'association pour la phase 2 est de 1000 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabine et 210 mg/m<sup>2</sup> de VX-970.

Le VX-970 offre un profil de toxicité plutôt bon avec une MTD (dose maximale tolérée) jamais atteinte (ou qui n'a pu être atteinte avec la gemcitabine), une DLT (toxicité dose limitante) pour seulement 4 patients sur 50 et un arrêt de l'escalade des doses à cause de la toxicité de la gemcitabine. La dose standard de gemcitabine est comprise entre 1000 à 1250 mg/m<sup>2</sup> ce qui correspond à celle utilisé dans la combinaison. Hormis la toxicité hématologique chimio-induite par la gemcitabine, la majorité des effets indésirables sont d'ordres hépatiques, ce qui laisse supposer un métabolisme hépatique important. La combinaison du VX-970 avec la gemcitabine est bien globalement bien toléré.

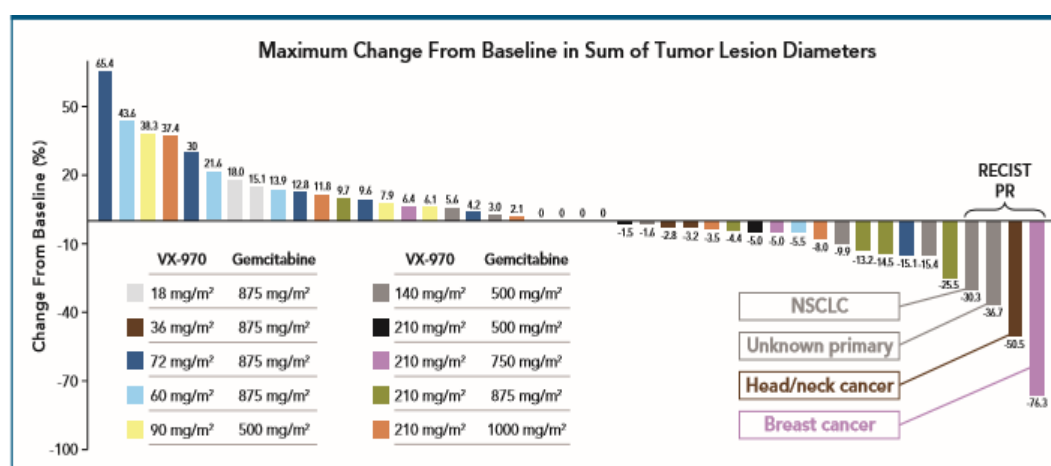
Table 3. VX-970 + Gemcitabine Dose Escalation			
VX-970 Dose, mg/m <sup>2</sup>	Gemcitabine Dose, mg/m <sup>2</sup>	Patients Treated/ DLT Evaluable, n	No. of Patients With DLTs (DLTs)
18	875	3/3	
36	875	3/3	
72	875	7/6	2 (grade 4 thrombocytopenia; grade 3 elevated ALT and fatigue)
60	875	4/3	
90	500	6/6	1 (grade 3 elevated AST)
140	500	8/6	1 (grade 2 elevated AST, grade 3 elevated ALT, grade 2 elevated ALP)
210	500	3/3	
210	750	3/3	
210	875	7/6	
210	1000	6/6	

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

**TABLEAU 19** : La DLT est survenue chez 4 patients

Au niveau clinique, les meilleures réponses tumorales globales selon les critères RECIST (*Best Tumor Overall Response*) ont été l'obtention d'une Réponse Partielle (PR) chez 4 patients. Ces réponses partielles ont été retrouvées dans un cancer du sein, un cancer de la tête et du cou, un CBNPC et carcinome d'origine inconnue. (Figure 39)

La meilleure réponse globale (BOR) se définit comme la meilleure réponse enregistrée depuis le début du traitement de l'étude jusqu'à la progression / récurrence de la maladie



**FIGURE 39** : Réponse tumorale du traitement VX-970 + gemcitabine. 4 patients ont un statut PR sur une moyenne de 12 semaines

La durée de la survie sans progression (SSP) chez de nombreux patients dépassait 12 semaines, ce qui était la principale période de suivi de cette étude.

Dans une comparaison non randomisée des patients, la SSP médiane était de :

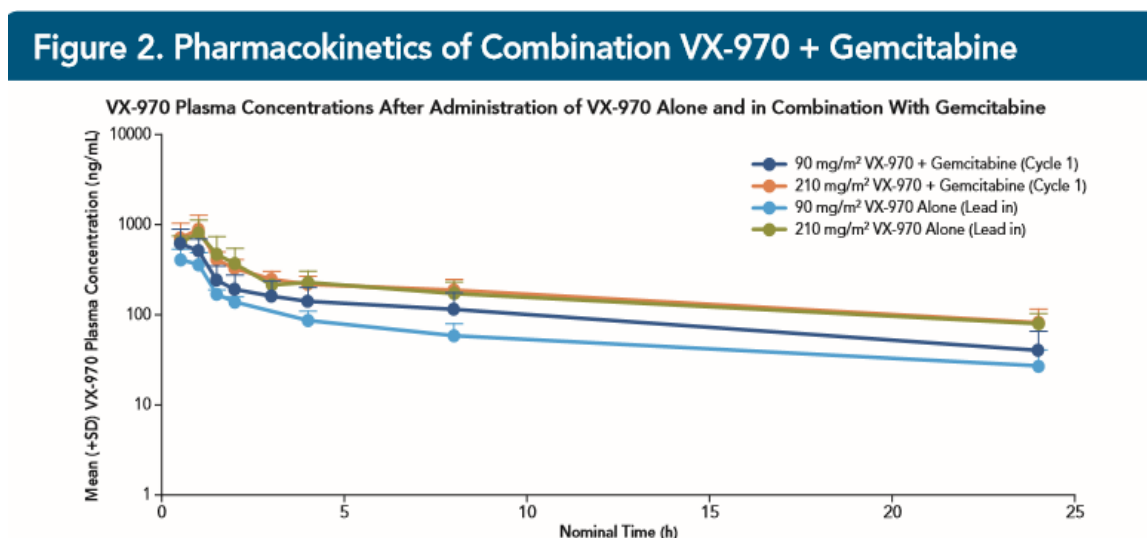
- 8,3 semaines chez ceux traités par une dose de VX-970 < 90 mg/m<sup>2</sup> + gemcitabine 875 mg/m<sup>2</sup>
- 29,3 semaines chez ceux traités par VX-970 ≥ 90 mg / m<sup>2</sup> avec gemcitabine 500 mg/m<sup>2</sup>

Sur le plan pharmacocinétique, le profil du VX-970 est plutôt linéaire avec une proportionnalité entre les doses administrées et les concentrations sériques. Cette linéarité se retrouve au niveau de l'exposition (l'aire sous la courbe temps-concentration-temps, AUC-<sub>0-∞</sub>) et de la concentration maximale (C<sub>max</sub>).

La demi-vie terminale est de ≈16 h ce qui représente un temps relativement court dans le champ des TC orale.

Mais surtout, il semble que la gemcitabine n'ait aucun effet apparent sur la pharmacocinétique du VX-970, ce qui est un excellent paramètre. De ce fait aucune adaptation posologique ne semble nécessaire (Figure 40)

Le poster ne fait cependant pas état de biomarqueurs prédictifs de la réponse ou d'effets indésirables.



**FIGURE 40** : Logarithme des profils cinétique du VX-970 associé à la gemcitabine

Ces bons résultats dans la globalité sont à modérer du fait qu'ils sont préliminaires. La fin de l'étude permettra de poser un jugement plus fiable. D'autre part l'existence de possibles conflits d'intérêts entre les auteurs et le laboratoire sponsor de l'étude.

## B. MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE

Dans le souci d'approfondir les caractéristiques pharmacocinétiques du VX-970, nous avons tenté de construire un modèle décrivant le comportement du composé dans l'organisme.

Pour ce faire nous avons réalisé une étude de population en utilisant les 4 profils cinétiques du poster décrivant les résultats préliminaires de la phase I. Bien que le nombre de profils soit suboptimal pour construire une étude pharmacocinétique de population, cela permettra d'émettre une description approximative du VX-970 dans le plasma humain.

### 1. Analyse des profils cinétiques

Les courbes temps/concentrations montrent une décroissance en deux phases : une rapide et une lente ce qui correspond de manière schématique à une phase de distribution et une phase d'élimination. Cette cinétique peut se décrire par un modèle à deux compartiments : un compartiment central où a lieu l'administration du VX-970 et sa distribution dans l'organisme (compartiment sanguin systémique) et un compartiment périphérique responsable de la décroissance lente (compartiment effecteur).

### 2. Digitalisation des données

Pour extraire des observations temps-concentrations à partir des profils cinétiques du poster nous avons utilisé le logiciel Engauge Digitizer® (version.9.8) permettant de digitaliser le

graphe temps/concentrations en valeur numériques en prenant bien soin de « dé-logué » les profils cinétiques et de choisir les axes abscisse/ordonnée et les unités des mesures.

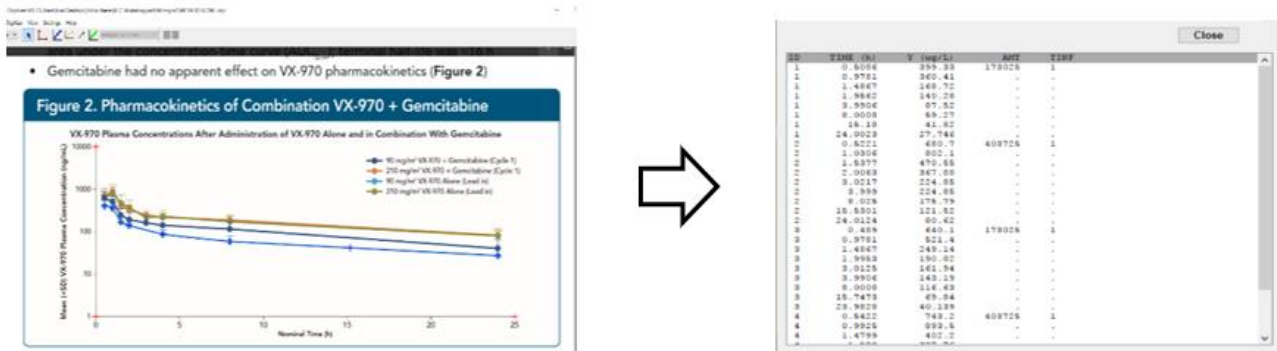


FIGURE 41 : Digitalisation des profils cinétiques en observations temps/concentration.

### 3. Choix de la structure du modèle

Étant donné la décroissance biphasique des profils cinétiques, nous choisissons un modèle à 2 compartiments. L'administration du VX-970 s'effectue dans le compartiment central.

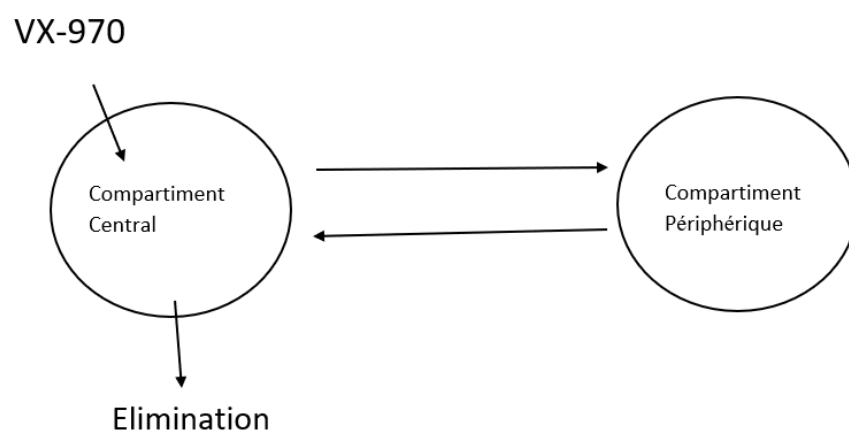


FIGURE 42 : Représentation d'un modèle à 2 compartiments.

#### 4. Choix des paramètres du modèle

Pour réaliser cette étude de pharmacocinétique de population nous avons utilisé le logiciel Monolix (v. 2016). Pour choisir les paramètres du modèle permettant de décrire le plus fidèlement possible les variations de concentration du VX-970 en fonction du temps, nous avons testé nos données avec plusieurs types modèles à 2 compartiments dans bibliothèque du logiciel de modélisation Monolix (v.2016). Le choix s'est porté sur deux types de paramètres :

- 1) Un modèle régit par des micro-constantes (M\_micro) : les constantes d'échanges entre les compartiments  $k_{1 \rightarrow 2}$ ,  $k_{2 \rightarrow 1}$ , le volume V du compartiment central, et la constante d'élimination k.
- 2) Un modèle régit par des constantes physiologiques (M\_physio) : la clairance inter compartimentale Q, les volumes des compartiments central V1 et périphérique V2 et la clairance Cl.

#### 5. Choix du modèle de l'erreur

Il existe 3 types de modèle de l'erreur résiduelle :

- Le modèle additif (homoscédastique)
- Le modèle proportionnelle (hétéroscédastique)
- Le modèle combiné

Après une trentaine d'essais (*run*) sur le logiciel, avec les différentes combinaisons possibles, entre le choix des paramètres et le modèle de l'erreur et les valeurs initiales, nous avons choisi le modèle M\_physio à 2 compartiments régit par 4 paramètres physiologique (V1, Q, V2 et Cl) et un modèle d'erreur proportionnelle. Ceci grâce à la comparaison de 2 critères :

- Le critère de la vraisemblance (*likelihood criteria* =  $-2\log LL$ ) qui fut plus élevé pour M\_micro que pour M\_physio traduisant une estimation des paramètres moins précise pour M\_micro.

- Les valeurs des R.S.E (*Roots square error*) des paramètres plus élevés pour M\_micro que pour M\_physio témoignant d'un écart plus grand entre les concentrations prédites et les concentrations réelles pour M\_micro notamment pour la clairance.

## 6. Fixation de la valeur des paramètres

Du fait, de l'effectif suboptimal de notre étude, la variabilité interindividuelle de certains paramètres reste élevée. Pour y remédier, nous avons fixé la valeur des paramètres qui ont une grande variabilité afin qu'elle s'annule. (Fixation de la valeur de Q et V2)

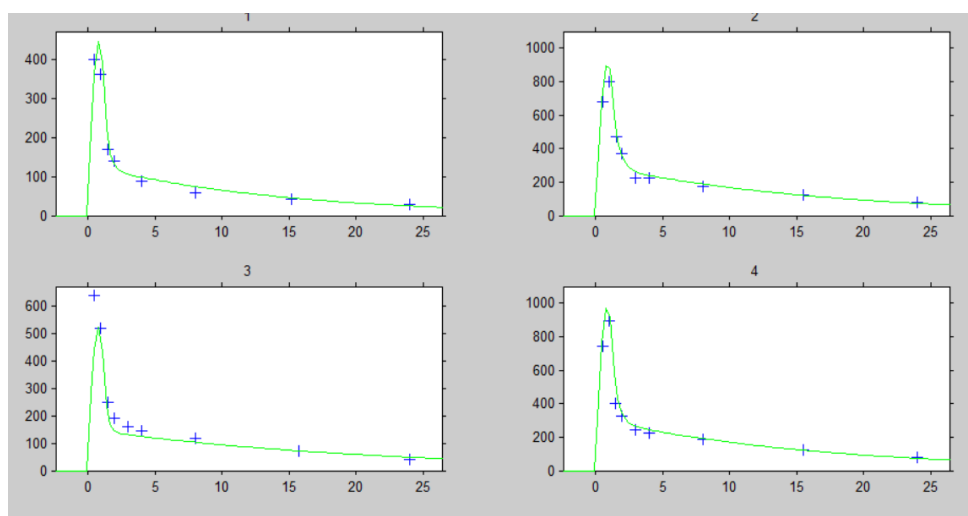
## 7. Résultats

Nous avons 4 équations paramétriques :

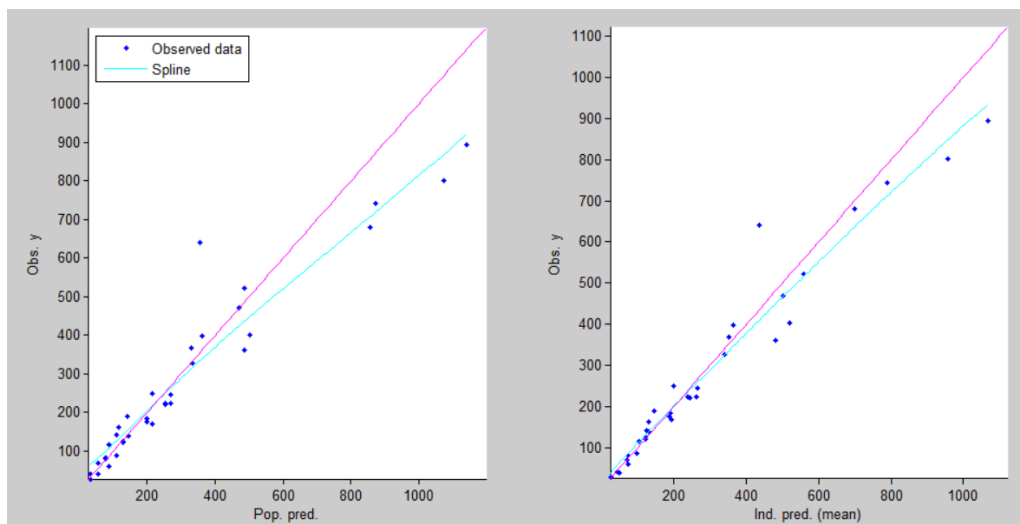
- $Cl_{pop} = 65.4 \text{ Litres/heure} \pm 0.194$
- $V1_{pop} = 139 \text{ Litres} \pm 0.35$
- $Q_{pop} = 296 \text{ Litres/heure} \pm 0$
- $V2_{pop} = 820 \pm 0$

Paramètres fixées, variabilité inter-individuelle nulle.

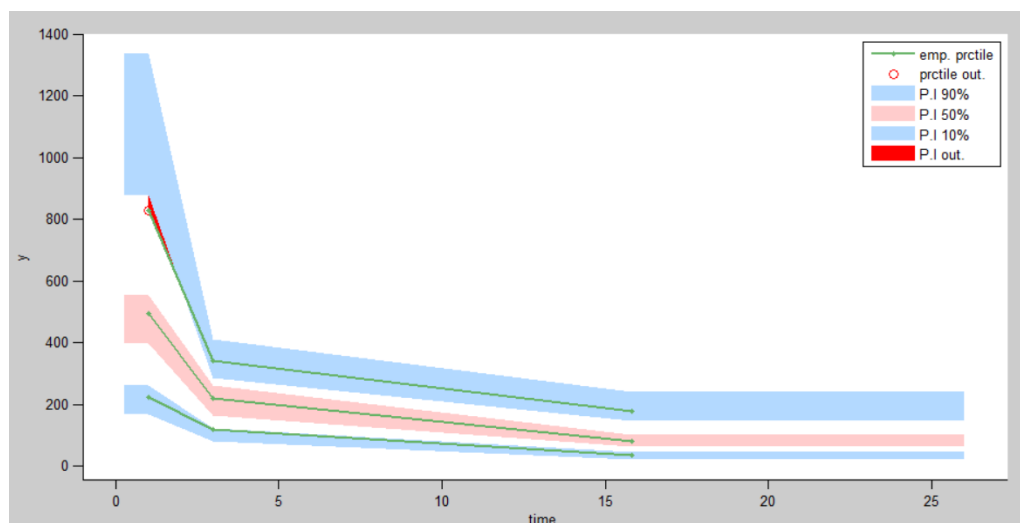
Les graphes suivants ont permis de valider le modèle ainsi choisi :



**FIGURE 43 :** « Fits » individuels. Il y a une correspondance relativement correcte entre les concentrations observées (croix bleues) et les concentrations prédites (courbe verte)



**FIGURE 44** : Observations vs. Prédictions. Nous pouvons voir que les prédictions (courbes turquoises) suivent le nuage des observations (points bleues)



**FIGURE 45** : VPC pour *Visual Predictive Check*. L'ensemble des prédictions de concentrations du modèle sont contenus dans les intervalles quantiles.



Concernant la valeur des paramètres de population estimés :

Si l'hypothèse d'un métabolisme d'élimination hépatique est confirmée, la clairance du VX-970 est proche de la valeur du débit hépatique ( $90\text{L/h}^{-1}$ ), ce qui implique un coefficient d'extraction hépatique élevé (0.72) traduisant une faible fixation protéique plasmatique (la fraction libre est captée par les hépatocytes).

Le volume  $V1_{\text{pop}}$  peut être assimilé au volume de distribution apparent qui est relativement important dans notre étude (139 Litres). Si cette estimation s'avère être juste, cela traduit une forte distribution tissulaire dans le compartiment périphérique et dans le même sens, une faible fixation protéique plasmatique.

Notons que le principal biais de cette étude de population est le faible nombre de sujet. A cela vient s'ajouter les erreurs expérimentales que nous avons pu commettre et qui viennent s'additionner aux erreurs expérimentales commises par les auteurs du poster, du fait de l'extraction de leurs données.

## C. LA VALIDATION D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE DE DOSAGE DU VX-970 DANS LE PLASMA HUMAIN PAR LC-MS/MS

En Juin 2016, le VX-970 faisait l'objet de 9 essais cliniques. (Tableau 20) [286] Cependant, aucune validation d'une méthode de dosage du VX-970 dans le plasma humain n'avait fait l'objet d'une publication dans un journal scientifique, bien que ce soit une étape préliminaire indispensable pour la réalisation des essais cliniques.

Target, Agent	Phase	Combination	Indication	NCT No.
ATR-VX-970, intravenous, Vertex pharmaceuticals (recently licenced to Merck KGaA, Germany)	1	irinotecan	Advanced solid tumours	NCT02595931
	1	Veliparib + Cisplatin	Advanced solid tumours	NCT02723864
	1/2	Topotecan	Advanced small cell lung, cervical, endometrial, ovarian cancers	NCT02487095
	2	Gemcitabine	Advanced ovarian/fallopian tube/primary peritoneal cancer(OC/FT/PP)	NCT02595892
	2	Carboplatin/Gemcitabine	Advanced OC/FT/PP	NCT02627443
	2	Cisplatin/Gemcitabine	Advanced urothelial cancers	NCT02567409
	1	Cisplatin/Radiotherapy	Locally advanced HPV negative SCC head and neck cancers	NCT02567422
	1	Whole brain radiotherapy	Non- small cell lung cancers with brain mets	NCT02589522
	1	Gemcitabine, Cisplatin, Etoposide, Carboplatin	Multiple parts including p53mut NSCLC, triple negative breast cancers	NCT02157792

**TABLEAU 20** : Études ouvertes et à recrutement actif évaluant le VX-970 en 2016 [286]

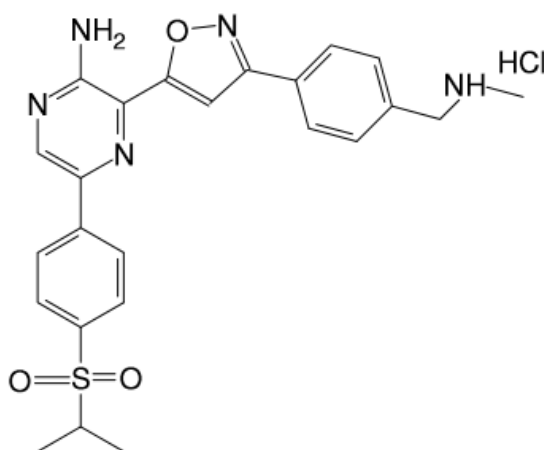
Dans le cadre du développement clinique du VX-970, le laboratoire de Pharmacocinétique/Pharmacodynamique du *University of Pittsburgh Cancer Institute* dirigé par le Dr Beumer a répondu à un appel d'offre pour développer la validation de cette méthode.

En support des essais cliniques en cours, et dans l'objectif de permettre les analyses pharmacocinétiques à venir, nous avons publié la validation d'une méthode analytique par LC-MS / MS pour la quantification précise, sensible et fiable du VX-970 dans le plasma humain.

La validation a été effectuée conformément aux directives de la FDA pour la validation de méthode bio-analytique. Cette méthode pourra être utilisée pour quantifier le VX-970 dans des échantillons de plasma provenant d'essais cliniques en cours et à venir.

## 1. Le VX-970

Le VX-970 est une molécule organique qui se présente sous deux formes : la forme basique libre (463.55 Da) et la forme ionisée liée à l'acide chlorhydrique HCl (500.01 Da). Son pKa est de 9,15. Elle est donc sous forme saline au pH physiologique. (Figure 46.)



**FIGURE 46** : Structure chimique du VX-970

D'après les études de relations structures-activités du précurseur, le VE-821, le domaine actif du VX-970 pour ATR repose sur l'hétérocycle izoxazole.

Sous forme anhydre, le VX-970 se présente sous la forme d'une poudre jaune. En solution cette couleur jaune persiste ce qui la rend photosensible. Par conséquent, il a fallu adapter la luminosité et le matériel utilisés conformément à cette caractéristique.

## 2. Les solvants

La solution mère du VX-970 était titrée à 1mg /mL dans le DMSO (diméthylsulfoxyde).

Concernant les solvants d'élutions utilisés pour l'HPLC, nous avons comparé, dans le cadre du solvant fort, l'éthanol et l'acétonitrile. Après plusieurs essais couplés à la spectrométrie de masse, aucune différence d'ionisation n'est apparue. De manière empirique, nous avons choisi l'acétonitrile car :

- Il permet une meilleure précipitation des protéines plasmatiques après centrifugation
- Il provoque généralement moins de pression dans la colonne
- Il offre une force d'élution plus importante

De ce fait, l'ensemble des solutions filles à savoir : la gamme d'étalonnage, les points de contrôles et l'étalon interne ont été diluée puis conservé dans l'acétonitrile.

L'eau a été choisie comme solvant faible. L'ajout de 0,1% d'acide formique dans chacun des deux solvants permet d'augmenter l'ionisation dans le spectromètre de masse.

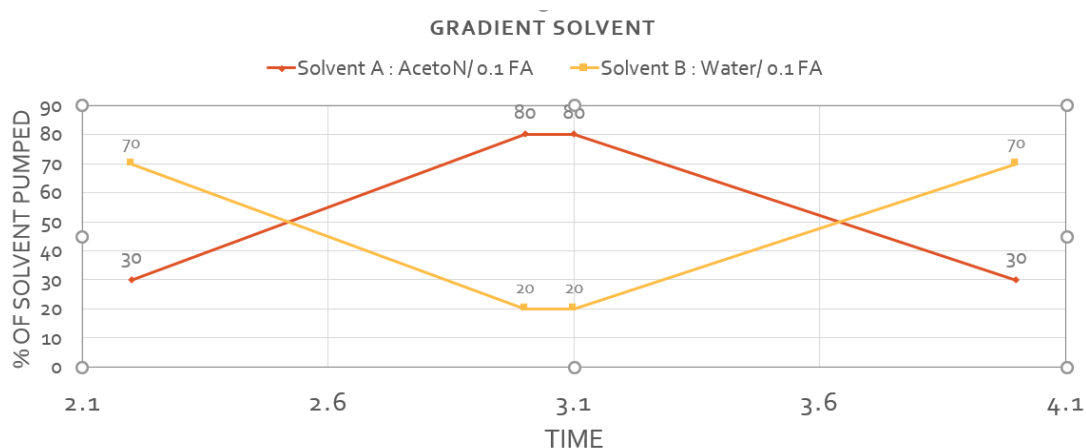
Des études préalables ont démontré la stabilité du VX-970 dans le plasma. De ce fait, la matrice utilisée pour la méthode analytique fut le plasma traité par EDTA. Au cours de l'essai nous avons réalisé une validation croisée des anticoagulants avec l'héparine sodique.

## 3. Le spectromètre de masse

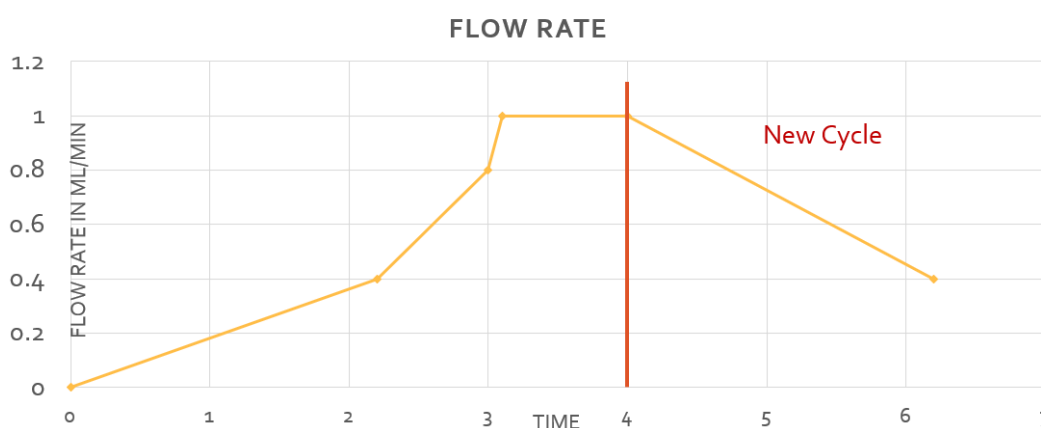
Le spectromètre de masse à été utilisée en tandem, avec un triple quadripôle. Cette structure repose sur l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision souvent constituée d'un quadripôle plus court. Utilisée avec le mode MRM (*Multiple reaction monitoring*), elle permet une double sélectivité avec une première analyse de l'ion parent et une deuxième analyse de l'ion produit faisant de ce mode, une méthode de choix pour une quantification sensible.

L'étalon interne utilisé pour la validation de la méthode fut le [d<sub>7</sub>]-VX-970 (Figure 47).





**FIGURE 48** : Le gradient des solvants pompés en pourcentages en fonction du temps par cycle d'analyse.



**FIGURE 49** : Le débit des solvants pompés en fonction du temps par cycle d'analyse

Pour la méthode en phase inverse nous avons comparé 3 colonnes :

- Luna Phenylhexyl (50 x 2.0 mm, 3 $\mu$ m),  $k' = 3.5$
- Synergi Hydro RP 80A (50 x 2.0 mm, 4  $\mu$ m),  $k' = 4.36$
- Synergi Polar RP 80A (50 x 2.0 mm, 4  $\mu$ m),  $k' = 4.56$

Les deux premières colonnes sont responsables de pics asymétriques et de hautes pressions dans la colonne. De ce fait, la 3<sup>ème</sup> colonne fut choisie. Le choix a été confirmé ultérieurement par le calcul du facteur de sélectivité ( $\alpha=2.98$ ) et du facteur de résolution ( $R_s > 5$ ).

## 5. Directives de la FDA pour la validation de méthode bio-analytique

Les recommandations de la FDA pour la validation d'une méthode bio-analytique repose sur 7 paramètres :

- l'exactitude c'est-à-dire la proximité entre la concentration réelle et la concentration dosée par la méthode.
- la précision c'est-à-dire la proximité entre les différentes valeurs de concentrations des mesures individuelles effectuées par la méthode
- la récupération compare la concentration d'une solution de VX-970 extraite d'un échantillon de plasma et la concentration d'une même quantité de VX-970 ajouté avant l'extraction. Cette comparaison permet d'évaluer l'effet de matrice potentiel sur le dosage de l'analyte.
- la spécificité, compare 6 lots individuels de plasma humain sans contrôle traités et analysés pour étudier les interférences potentielles des composants de la matrice avec le dosage de l'analyte
- la sensibilité, évalue le rapport de l'aire sous la courbe de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.
- la reproductibilité, compare les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour
- la stabilité compare les concentrations de plusieurs solutions selon les différentes conditions physiques : 8 mois dans les conditions de stockage à -80°C, 6h dans les conditions de manipulation à température ambiante, 3 jours dans des les conditions de congélation/décongélation, 4h dans le plasma à température ambiante, après réinjection dans l'appareillage 3 jours après une première injection. L'ensemble de ces échantillons est comparé à un échantillon fraîchement décongelé et analysé.

La publication est en annexe III.

Peu de temps après la fin de la validation de la méthode, le centre anticancéreux de Pittsburgh faisait son entrée dans l'essai clinique multicentrique de phase I (NCT02595931) évaluant la combinaison VX-970 + irinotécan. Le 1<sup>er</sup> patient traité par la combinaison eu lieu en juin 2016.

## CONCLUSION

Les dernières années, ont vu opérer un changement de paradigme dans la prise en charge du cancer en passant d'une cancérologie « d'organe » à une cancérologie « stratifiée » et qui de nos jours, devient une cancérologie « personnalisée » dans laquelle les TC jouent un rôle primordial. Cette nouvelle cancérologie s'intègre dans la médecine de précision qui est guidée, dans la mesure du possible, par les caractéristiques moléculaires de la tumeur propre à chaque patient notamment grâce aux biomarqueurs permettant d'identifier les patients porteurs de l'anomalie moléculaire à cibler.

Initialement restreinte à un nombre limité de patients, l'utilisation des TC s'est généralisée à tous les stades de la pathologie pour la grande majorité des localisations tumorales grâce à la découverte de nouvelles cibles et de mécanismes communs à la cancérogénèse, ce qui tend à pouvoir traiter un nombre beaucoup plus grand de sous-groupes de patients. Aujourd'hui les TC représentent plus d'un quart des spécialités antitumorales, dans 98 indications thérapeutiques, ciblant 24 voies oncogéniques. Que ce soit le traitement de la LMC (imatinib) et du cancer du sein HER2+ (trastuzumab) il y a plus de 10 ans, ou l'avènement des CAR-T plus récemment, le ciblage thérapeutique de précision est à l'origine de révolutions dans la prise en charge de nombreux cancer. A l'avenir, une nouvelle vague de bouleversement thérapeutique est attendu, notamment en 1<sup>ère</sup> ligne, du fait de la récente mise sur le marché des agents de l'immunothérapie spécifique qui apparaît déjà être révolutionnaire par leurs spectres d'activités et pour le taux de survie globale qu'elles engendrent chez les patients traités. Cependant la *Financial Toxicity* qu'entraîne l'utilisation des TC, interroge sur la soutenabilité des systèmes de soins à maintenir un accès à l'innovation et aux meilleurs traitements pour tous les patients dans une pathologie mortelle.

Dans la stratégie d'adopter le ciblage thérapeutique, à l'émergence de clones tumoraux résistants, l'exploitation de la DDR a ouvert une nouvelle voie efficace et pertinente qui a permis la mise sur le marché en 2015 d'un inhibiteur de la protéine PARP dont l'olaparib



indiqué dans le cancer du sein et de l'ovaire mutés BRCA 1 / 2 opérant par un mécanisme original de létalité synthétique. Depuis le succès des PARPi, les investigations précliniques ont largement exploré les différents phénotypes tumoraux de la DDR afin de les exploiter par des thérapies hautement sélectives. Notons à ce titre l'intérêt grandissant des modèles mathématiques mécanistiques pour l'exploration et les prédictions des comportements des voies de signalisations dans le cadre d'un environnement mutationnel important.

Ces recherches sur le ciblage des voies de la DDR ont notamment révélé le pouvoir potentialisateur des agents endommagent l'ADN que sont la radio-chimiothérapie.

Dans le cadre de cette stratégie, le ciblage de la voie ATR-Chk1 permet d'exploiter les niveaux élevés de stress réplicatifs au sein de la cellule tumorale ainsi que leurs hyper-dépendances au point de contrôle S/G2 du cycle cellulaire. Faisant suite aux résultats favorables des études précliniques sur divers modèles cellulaires et animaux, le VX-970, premier inhibiteur de la protéine ATR entre en essai clinique de phase I en combinaison successive avec deux agents cytotoxiques. Les résultats préliminaires de cette phase I, présentés lors de la session 2016 de l'ASCO semble prometteur. En effet le VX-970 associé à la gemcitabine aurait un profil de toxicité tolérable, une réponse clinique au bout de 12 semaines prometteuse particulièrement marqué chez le phénotype p53 muté et/ou ATM déficient, et une pharmacocinétique approximativement linéaire sans qu'il y ait aucune interaction de la gemcitabine sur son profil cinétique.

En 2017, le VX-970 fait l'objet de 9 essais cliniques dont 3 phases II impliquant la nécessité de sa description pharmacocinétique complète. Dans le but de soutenir ces investigations, nous avons développé une méthode analytique par LC-MS / MS pour la quantification précise, sensible et fiable du VX-970 dans le plasma humain, conformément aux directives de la FDA pour la validation de méthode bio-analytique. Cette méthode pourra être utilisée pour quantifier le VX-970 dans des échantillons de plasma provenant d'essais cliniques en cours et à venir. Nous avons choisi une gamme d'étalonnage englobant l'ensemble du profil cinétique d'un patient traité par VX-970 au sein du centre anticancéreux. De plus, la Cmax de ce profil était largement inférieure à la limite supérieure de quantification, ce qui permettra à la méthode de rester fiable à mesure que la dose et les concentrations sérique augmenteront.

Après précipitation des protéines plasmatiques, la chromatographie de l'échantillon a été réalisée avec une colonne Phenomenex Polar-RP 80A (4 µm, 50 x 2 mm) et une phase mobile gradient acétonitrile-eau avec 0,1% d'acide formique. La détection a été réalisée par un spectromètre de masse ABI 4000 en mode ionisation positive par électronébulisation (*Electrospray Ionization Positive*). La méthode de dosage est linéaire pour des concentrations allant de 3 à 5 000 ng / mL et se révèle à la fois précise (94,6-98,5%) et spécifique (CV <8,4%).

En conclusion, nous avons réussi à publier une méthode analytique par LC-MS / MS pour la quantification du VX-970 dans le plasma humain, en couvrant toute la plage de concentration clinique. Ce test pourra être un outil précieux en support du développement clinique du VX-970 aux résultats précoces prometteurs.

# BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

- [1] Douglas Hanahan et Robert Weinberg, The hall marks of cancer “next generation” dans Cell en 2000
- [2] Solary E, A reductionist approach of cancer, Med Sci (Paris). 2014 Jun-Ju
- [3] Stephen G. O’Brien, et al. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia N Engl J Med 2003 ;
- [4] Mise à disposition de thérapies ciblées : l’ANSM mobilisée à toutes les étapes rapport de l’ANSM, Point d’information, 2012.
- [5] Rapport sur les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015 - État des lieux et enjeux. Institut national du cancer/ANSM
- [6] Versteeg et al Cancer : tumors outside the mutation box, Nature 2014
- [7] Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. Bartek J1, Oncogene. 2007 Dec 10 ;26(56):7773-9.
- [8] Lindahl T Et al. Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2000 ; 65 :127-33.
- [9] J. Wade Harper et al. The DNA Damage Response: Ten Years After. Mol Cell. 2007 Dec 14 ;28(5):739-45 Breast cancer susceptibility genes.
- [10] Kerzendorfer C et al. [Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. DNA Repair (Amst). 2009 Sep 2 ;8(9):1139-52. Epub 2009
- [11] Amy Dréan et al. PARP inhibitor combination therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Dec; 108:73-85. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.10.010. Epub 2016 Oct 31.
- [12] Karnitz LM, et al. Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy Clin Cancer Res. 2015 Nov, Epub 2015

## Partie I : LES THÉRAPIES CIBLÉES EN ONCOLOGIE

- [13] Site internet de l’ANSM : <http://ansm.sante.fr/> - Dossier ATU nominatives - Spécialités autorisées entre le 01/10/2017 et le 31/10/2017 (16/11/2017) application/vnd.ms-excel
- [14] Site internet de l’ANSM. Définition de l’Autorisation Temporaire d’Utilisation (ATU)
- [15] Site internet de l’Institut National du Cancer (l’INCa): <http://www.e-cancer.fr/> Rapport sur l’utilisation des anticancéreux sous ATU.

- [16] Site internet de l'Organisation Mondiale de la Santé – Le Cancer dans le Monde en 2015  
<http://www.who.int/fr/>
- [17] Notice du médicament Bevacizumab sur le site de l'Agence Européenne du Médicament (l'EMA)
- [18] Rapport de l'HAS - Des progrès thérapeutiques pour certains cancers métastatiques de la prostate - Jevtana®, Xtandi® et Zytiga®
- [19] Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets. Cancer Treat Rev. 2003 Dec ;29(6):515-23 Espinosa E et al.
- [20] Classification des anticancéreux selon le Collège National de Pharmacologie Médicale (CNPM) <http://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticancereux-les-points-essentiels?>
- [21] Neal JW et al. Decade in review-targeted therapy: successes, toxicities and challenges in solid tumours. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Nov; 11(11):627-8. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.171. Epub 2014
- [22] Jean-Francois Morère, Françoise Mornex, Denis Soulières, Thérapeutique du Cancer – 2eme edition, Edition Springer
- [23] Karen Leroy, Patricia de Cremoux, Anomalie moléculaires des cancers. Ciblage thérapeutique. Edition John Libbey Eurotext
- [24] Jean-Charles Soria, Stéphane Vignot, Christophe Massard, Olivier Mir Cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer XXVIIIème cours de Gustave-Roussy
- [25] Stéphane Vignot, Jean-Charles Soria Thérapies moléculaires ciblées Edition John Libbey Eurotext. Mai 2008
- [26] Gaetan des Guetz et Jean-Yvez Blay Les thérapies ciblées
- [27] Cornez N, Breast cancer and Herceptin. Bull Cancer. 2000 Nov;87(11):847-58.
- [28] Leyland-Jones B, Trastuzumab: hopes and realities Lancet Oncol. 2002 Mar;3(3):137-44.
- [29] Slamon DJ et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 Jan 9; 235(4785):177-82.
- [30] Mitchell MS et al. The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. Semin Oncol. 1999 Aug; 26(4 Suppl 12):108-16.
- [31] Révillion F. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. Eur J Cancer. 1998 May; 34(6) :791-808.
- [32] Carlomagno C et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. J Clin Oncol. 1996 Oct; 14(10):2702-8
- [33] Elledge RM et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. Clin Cancer Res. 1998 Jan; 4(1):7-12

- [34] Houston SJ et al. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1999 Mar; 79(7-8):1220-6.
- [35] Pegram MD et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells *Oncogene*. 1997 Jul 31; 15(5):537-47
- [36] Slamon DJ et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15; 344(11):783-92.
- [37] Von Minckwitz et al. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a german breast group 26/breast international group 03-05 study. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20; 27(12):1999-2006. doi:10.1200/JCO.2008.19.6618. Epub 2009 Mar 16.
- [38] Site internet de l'INCa – Prise en charge thérapeutique du cancer su sein <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Traitements>
- [39] Eisenberg BL (2003) Imatinib mesylate: a molecularly targeted therapy for gastro intestinal stromal tumors. *Oncology* 11:1-6
- [40] Duensig A et al. (2004) Biology of gasdtrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Inveszt* 22: 106-16
- [41] Mahon FX et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010 Nov ;11(11) :1029-35. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70233-3. Epub 2010.
- [42] Francois Brécheteau et al. How Did We Obtain Complete Remission in Patients Who Had Metastatic Renal Cancer in the Era of Targeted Therapies? *Annals of Surgical Oncology* [23 Sep 2016, 24(2):369-374]
- [43] Amato RJ et al. Chemotherapy for renal cell carcinoma *Semin Oncol*. 2000 Apr ;27(2):177-86.
- [44] Foss SD et al. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2000 Apr ;27(2):187-93
- [45] The Lancet Medical Research Council Renal Cancer Collaborators Interferon- $\alpha$  and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial *Volume* 353, No. 9146, p14–17, 2 January 1999
- [46] Motzer RJ et al. Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2000 May;18(9):1928-35.
- [47] Atzpodien J. et al. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immune chemotherapy in advanced renal cell carcinoma: A Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol*. 2004 Apr 1;22(7):1188-94. Epub 2004 Feb 23.
- [48] Mickisch GH et al. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):966-70.

- [49] Flanigan RC et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 6;345(23):1655-9.
- [50] Fujikawa K et al. Serum immunosuppressive acidic protein and natural killer cell activity in patients with metastatic renal cell carcinoma before and after nephrectomy. *J Urol*. 2000 Sep;164(3 Pt 1):673-5.
- [51] Rini BI. The evolving role of surgery for advanced renal cell carcinoma in the era of molecular targeted therapy.
- [52] Foster K. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet*. 1994 Dec;3(12):2169-73.
- [53] Richard S Genetics and angiogenesis: the example of von Hippel-Lindau disease. *Bull Cancer*. 2007 Jul;94 Spec No: S170-9.
- [54] Yang JC et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 31;349(5):427-34.
- [55] Escudier B Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007 Dec 22;370(9605):2103-11. et al.
- [56] Motzer RJ et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):115-24.
- [57] Site de l'Agence Européenne du Médicament – AMM du Sunitinib - L'agence européenne du médicament.
- [58] Sternberg CN et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):1061-8. doi: 10.1200/JCO.2009.23.9764. Epub 2010 Jan 25.
- [59] Escudier B et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):125-34.
- [60] Motzer RJ et al. Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):552-62. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70093-7. Epub 2013 Apr 16.
- [61] George S et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated Beyond Progression: A Subgroup Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016 Sep 1;2(9):1179-86. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0775
- [62] George S et al. Renal cell carcinoma and antiangiogenic agents: Ongoing controversies are seeking answers for improvement of therapeutic management. *Progrès en urologie* (2009) 19, 596—605 F. Audenet et al.
- [63] Barlesi et al. Biomarqueurs France: résultats de l'analyse en routine de EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3K, et ALK sur 10 000 patients (pts) atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) *Revue des Maladies Respiratoires* Volume 31, numéro S1 F..

- [64] Site internet de l’HAS - COMMISSION DE LA TRANSPARENCE Avis du 17 mai 2017 concernant le pembrolizumab. [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-15941\\_KEYTRUDA\\_PIC\\_EI\\_poumon\\_1ere\\_ligne\\_Avis2\\_CT15941.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-15941_KEYTRUDA_PIC_EI_poumon_1ere_ligne_Avis2_CT15941.pdf)
- [65] P. Tomasini Thérapies moléculaires ciblées en cancérologie pulmonaire. EMC - Pneumologie 2017;1-9 [Article 6-002-L-13].
- [66] Mok, T. S. et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957 (2009).
- [67] Rosell, R. et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 239–246 (2012), ]
- [68] Wu, Y.-L. et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, openlabel, ENSURE study. *Ann. Oncol.* mdv270 (2015). doi:10.1093/annonc/mdv270 ]
- [69] Mitsudomi, T. et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 11, 121–128 (2010). ]
- [70] Maemondo, M. et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* 362, 2380–2388 (2010). ]
- [71] Han, J.-Y. et al. First-SIGNAL: First-Line Single-Agent Iressa Versus Gemcitabine and Cisplatin Trial in Never-Smokers with Adenocarcinoma of the Lung. *J. Clin. Oncol.* 30, 1122–1128 (2012)]
- [72] Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 213–222 (2014).
- [73] Wu, Y.-L. et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With EGFR Mutations. *J. Clin. Oncol.* 31, 3327–3334 (2013)  
] Sequist, L. V. et al.
- [74] Sequist, L. V. et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients with Metastatic Lung Adenocarcinoma with EGFR Mutations. *J. Clin. Oncol.* 31, 3327–3334 (2013)]
- [75] K. Wolffe et al. Chapter 124: Cutaneous melanoma,” in Fitzpatrick’s Dermatology In General Medicine, Seventh Edition: Two Volumes, 7th ed., vol. 1, 2 vols., McGraw-Hill Companies, Incorporated, 2007, pp. 1134–1157
- [76] R. Mouawad, D. Khayat, and J.-P. Spano, “Les mélanomes : facteurs pronostiques et traitements adjuvants. Traitement médical du mélanome malin métastatique,” in *Thérapeutique du cancer*, Paris: Springer Paris, 2011, pp. 673–683.
- [77] C. Garbe, K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, A. Spatz, J.-J. Grob, J. Malvehy, J. Newton-Bishop, A. Stratigos, H. Pehamberger, and A. Eggermont, “Diagnosis and treatment of melanoma: European consensusbased interdisciplinary guideline,” *European Journal of Cancer*, vol. 46, no. 2, pp. 270–283, Jan. 2010.
- [78] M. R. Albertini et al. B. J. Longley, P. M. Harari, and D. Reintgen, “Cutaneous Melanoma,” in *Oncology*, Eds. New York, NY: Springer New York, pp. 1082–1101.

- [79] L. Finn, S. Markovic, and R. Joseph, "Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future," *BMC Medicine*, vol. 10, no. 1, p. 23, Mar. 2012.
- [80] E. Vakiani and D. B. Solit, "KRAS and BRAF : drug targets and predictive biomarkers," *The Journal of Pathology*, vol. 223, no. 2, pp. 220–230, 2011.
- [81] K. T. Flaherty and G. McArthur, "BRAF, a target in melanoma," *Cancer*, vol. 116, no. 21, pp. 4902–4913, 2010.
- [82] J. A. Sosman, et al. "Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib," *New England Journal of Medicine*, vol. 366, no. 8, pp. 707–714, 2012.
- [83] A de la Fouchardière, "Mélanome et recherche de cibles thérapeutiques," *Annales de pathologie*, no. 31, pp. 123–124, Oct. 2011.
- [84] E. Espinosa and P. Chillet, "Chapitre 10: Le lymphocyte Th au centre de la réponse immunitaire," in *Immunologie*, Ellipses Marketing, 2010, pp. 245–287
- [85] Kaplan MG. Ipilimumab plus Dacarbazine in Melanoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 13, pp. 1256–1258, 2011.
- [86] Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 8, pp. 711–723, 2010. F. S. Hodi et al.
- [87] Robert C et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22; 372(4):320-30. doi: 10.1056/NEJMoa1412082. Epub 2014 Nov 16
- [88] Weber JS et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Apr; 16(4):375-84. Epub 2015 Mar 18.
- [89] Rapport des innovations thérapeutiques dans le mélanome au congrès de l'American Association for Cancer Research (AACR) à la Nouvelle-Orléans de 2016 par le site d'information APMnews - [www.apmnews.com/](http://www.apmnews.com/)
- [90] Critères RECIST version 1.1 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors [http://www.cepd.fr/CUSTOM/RECIST\\_1.1.pdf](http://www.cepd.fr/CUSTOM/RECIST_1.1.pdf)
- [91] Daniel Gioeli Targeted therapies: Mechanisms of resistance Molecular and translational medicine. Edition Humana Press
- [92] Lackner MR et al. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies *Future Oncol*. 2012 Aug ;8(8):999-1014. doi: 10.2217/fon.12.86.
- [93] Branford S et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphatebinding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002 ; 99(9):3472–5.
- [94] Hofmann WK et al. Ph (+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation. *Blood*. 2002 ;99(5) :1860–2
- [95] Shyamala Maheswaran et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells *N Engl J Med*. 2008 Jul 24 ; 359(4): 366–377 2008 Jul 2.
- [96] Weisberg E et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinibresistant



chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2007 ;7(5):345–56

[97] Mulloy R et al. Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib. *Cancer Res*. 2007 ;67(5): 2325–30

[98] Sequist LV et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl Med*.3(75),75ra26 (2011).

[99] Engelman JA et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance Mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest*. 2006 ;116(10):2695–706.

[100] Liegl B et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol*. 2008 ;216(1):64–74

[101] Balak MN et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growthFactor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2006 ;12(21):6494–501

[102] Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002 ; 100 : 1014–1018.

[103] Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013 ; 152 : 714–726

[104] Klc JM, Spencer DH, Miller CA, *et al*. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2014 ; 25 : 379–392.

[105] Diaz LA, Jr, Bardelli A. Liquid biopsies : genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014 ; 32 : 579–586.

[106] amal-Hanjani M, Thanopoulou E, Peggs KS, et al. Tumour heterogeneity and immune-modulation. *Curr Opin Pharmacol* 2013 ; 13 : 497–503

[107] Sos ML, Koker M, Weir BA *et al*. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res*.69(8),3256–3261 (2009)

[108] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D *et al*. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl Med*.3(75),75ra26 (2011)

[109] Nagy P, Friedlander E, Tanner M *et al*. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res*.65(2),473–482 (2005).

[110] Scaltriti M, Serra V, Normant E *et al*. Antitumor activity of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in HER2-positive trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther*.10(5),817–824 (2011).

[111] Modi S, Stopeck AT, Gordon MS *et al*. Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a Phase I dose-escalation study. *J. Clin. Oncol*.25(34),5410–5417 (2007).

[112] McDermott U, Pusapati RV, Christensen JG, Gray NS, Settleman J. Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res*.70(4),1625–1634 (2010).

- [113] Sequist LV, Gettinger S, Senzer NN *et al.* Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 28(33),4953–4960 (2010).
- [114] Wagle N, Emery C, Berger MF *et al.* Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* 29(22),3085–3096 (2011).
- [115] Hatzivassiliou G, Liu B, O'Brien C *et al.* ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 11(5),1143–1154 (2012).
- [116] Muellner MK, Uras IZ, Gapp BV *et al.* A chemical-genetic screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer. *Nat. Chem. Biol.* 7(11),787–793 (2011).
- [117] Peng XX, Tiwari AK, Wu HC, Chen ZS. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. *Chin. J. Cancer* 31(2),110–118 (2012).
- [118] Mahon FX, Hayette S, Lagarde V *et al.* Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.* 68(23),9809–9816 (2008).
- [119] Theou N, Gil S, Devocelle A *et al.* Multidrug resistance proteins in gastrointestinal stromal tumors: site-dependent expression and initial response to imatinib. *Clin. Cancer Res.* 11(21),7593–7598 (2005).
- [120] Miller TW, Perez-Torres M, Narasanna A *et al.* Loss of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 69(10),4192–4201 (2009).
- [121] Rexer BN, Ghosh R, Arteaga CL. Inhibition of PI3K and MEK: it is all about combinations and biomarkers. *Clin. Cancer Res.* 15(14),4518–4520 (2009).
- [122] Buonamici S, Williams J, Morrissey M *et al.* Interfering with resistance to Smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci. Transl Med.* 2(51),51ra70 (2010).
- [123] Sasaki T, Koivunen J, Ogino A *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res.* 71(18),6051–6060 (2011).
- [124] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T *et al.* *MET* amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316(5827),1039–1043 (2007).
- [125] Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29(33),4452–4461 (2011).
- [126] Miller TW, Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM *et al.* Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 120(7),2406–2413 (2010).
- [127] Chen Y, Sawyers CL, Scher HI. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr. Opin Pharmacol.* 8(4),440–448 (2008).
- [128] Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J *et al.* Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* 19(5),575–586 (2011).

- [129] Rexer BN, Ghosh R, Arteaga CL. Inhibition of PI3K and MEK: it is all about combinations and biomarkers. *Clin. Cancer Res.*15(14),4518–4520 (2009).
- [130] Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M *et al.* AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*19(1),58–71 (2011).
- [131] Chakrabarty A, Sanchez V, Kuba MG, Rinehart C, Arteaga CL. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*109(8),2718–2723 (2011).
- [132] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA *et al.* Epithelial versus mesenchymal phenotype determines *in vitro* sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*11(24 Pt 1),8686–8698 (2005).
- [133] Gupta PB, Onder TT, Jiang G *et al.* Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*138(4),645–659 (2009).
- [134] Chung JH, Rho JK, Xu X *et al.* Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer*73(2),176–182 (2011).
- [135] Li X, Lewis MT, Huang J *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl Cancer Inst.*100(9),672–679 (2008).
- [136] Sharma SV, Lee DY, Li B *et al.* A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*141(1),69–80 (2010).
- [137] Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *Int. J. Cancer*129(10),2310–2314 (2011).
- [138] Guix M, Faber AC, Wang SE *et al.* Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J. Clin. Invest.*118(7),2609–2619 (2008).
- [139] Morgillo F, Cascone T, D'Aiuto E *et al.* Antitumour efficacy of MEK inhibitors in human lung cancer cells and their derivatives with acquired resistance to different tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Cancer*105(3),382–392 (2011).
- [140] Corcoran RB, Ebi H, Turke AB *et al.* EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.*2(3),227–235 (2012).
- [141] Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.*65(23),11118–11128 (2005).
- [142] Sun Y, Wang BE, Leong KG *et al.* Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate : implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res.*72(2),527–536 (2011).
- [143] Groupe de travail bas normand THECITOX, Karine Bouhier-Leporrier *et al.* Prise en charge des effets secondaires des thérapies ciblées Edition Potentiel d'Action
- [144] Coquan E *et al.* Principes de prise en charge des effets indésirables des thérapies ciblées en cancérologie. La revue du praticien, 2012, vol.62

- [145] Chevreau C. Les effets secondaires des anti-angiogéniques (à l'exception des effets cutanés). *Oncologie*, 2009, vol 11, pp 285-290
- [146] Alliance Pour la Recherche En Cancérologie (APREC), Cellule Information Conseil des Thérapies Ciblées des Cancers, Maxime Japkowicz, Tevy San, Joseph Gligoro Cancers, thromboses veineuses et traitements anti-angiogéniques <http://www.jle.com/>
- [147] Sibaud V, et al. Effets indésirables dermatologiques des thérapies ciblées angiogéniques. *Bulletin du cancer*, 2011, vol 98, n°10, pp 1221-1229
- [148] Lacouture M et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of EGFR inhibitor-associated dermatologic toxicities. *Support Care Cancer*, 2011 vol 19 pp1079-1095
- [149] Guilhot F et al. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. *The oncologist* 2004, vol 9, pp271-28
- [150] Bouché O et al. Prise en charge des effets secondaires des thérapeutiques ciblées (hors dermatologiques). *Hepato-Gastro*, vol 14 pp15-23
- [151] Halimi JM, et al. Effets vasculaires et rénaux des médicaments anti-angiogéniques : recommandations françaises pour la pratique. *Sang thrombose vaisseaux*, 2009, vol.21 pp 151-166.
- [152] Izzedine H, et al. Gestion des effets secondaires des thérapies ciblées dans le cancer du rein : Effets secondaires néphrologiques. *Bulletin du cancer* 2011 vol 98 pp 7-18
- [153] Jabbour E, Deininger M et al. Management of adverse events associated with tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique. *Leukemia*, 2011 pp 2010
- [154] Rea D et al. Aspects pratiques des traitements par inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique. *Hématologie* 2009 vol15 n°3
- [155] Bossert C et al. Les complications thyroïdiennes des inhibiteurs de tyrosine kinase. *Médecine thérapeutique*, 2011 vol 17 n°4 pp 302-309
- [156] Peter Singer, Why We Must Ration Health Care ? New York Times Published: July 15, 2009 <http://www.nytimes.com/2009/07/19/magazine/19healthcare-t.html?pagewanted=all>
- [157] Fojo T. and Grady C. How Much Is Life Worth: Cetuximab, Non – Small Cell Lung Cancer, and the \$440 Billion Question *J Natl Cancer Inst* 2009, 101: 1044–1048 .
- [158] Rapport de la ligue contre le cancer, Pourrons-nous tous être soignés en 2016 ? Sauvons notre système de santé [https://www.ligue-cancer.net/article/35294\\_pourrons-nous-tous-etre-soignes-en-2016-sauvons-notre-systeme-de-sante](https://www.ligue-cancer.net/article/35294_pourrons-nous-tous-etre-soignes-en-2016-sauvons-notre-systeme-de-sante)
- [159] Prix et accès aux traitements médicamenteux innovants, Avis du Conseil économique, social et environnemental, 6 février 2017
- [160] Rapport de l'Institut National du Cancer, Aïda Bigot et al. Le prix des médicaments anticancéreux, Etats des lieux et des connaissances. Mai 2017
- [161] Zafar SY Financial Toxicity of Cancer Care : It's Time to Intervene *J Natl Cancer Inst*. 2015 Dec 11 ;108(5). pii: djv370. doi: 10.1093/jnci/djv370. Print 2016 May.

## Partie II : LA RÉPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN (DNA DAMAGE RESPONSE)

- [173] Lindahl T et al. Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2000; 65:127-33.
- [174] Autexier C Et al. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. Trends Biochem Sci. 1996 Oct;21(10):387-91.
- [175] Cortes-Ciriano I, et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. Nat Commun. 2017.
- [176] Craig H Bassing et al. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination Cell Volume 109, Issue 2, Supplement 1, 19 April 2002, Pages S45-S55
- [177] Mécanismes des agressions radioinduites – Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) [www.irsn.fr/](http://www.irsn.fr/)
- [178] Rapport de l'INSERM sur le mécanisme Mécanismes d'action des pesticides en cancérogenèse [www.ipubli.inserm.fr/](http://www.ipubli.inserm.fr/)
- [179] Les effets cocktails des substances toxiques démontrés in vitro - L'Institut national de la recherche agronomique (INRA) [institut.inra.fr/](http://institut.inra.fr/)
- [180] Mise à jour de la liste des des substances mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) par Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement (ANSES) [www.anses.fr/](http://www.anses.fr/)
- [181] Weitzman MD et al. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. Cell Host Microbe. 2014 Mar 12 ;15(3):283-94. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.010.
- [182] Nougayrède JP et al. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science. 2006 Aug 11 ;313(5788) :848-51.
- [183] Jang SH et al. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. Free Radic Biol Med. 2012 Feb 1;52(3):607-615.. Epub 2011 Nov 20.
- [184] Luftig MA et al. Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. Annu Rev Virol. 2014 Nov ;1(1):605-25.. Epub 2014 Jul 16.
- [185] Speck SH et al. Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. Cell Host Microbe. 2010 Jul 22 ;8(1):100-15..
- [186] Lindahl T Et al. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 1993 Apr 22 ;362(6422):709-15.
- [187] Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. Nat Rev Genet. 2008 Aug ;9(8):619-31. .
- [188] Vilenchik MM et al. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 28;100(22):12871-6. Epub 2003 Oct 17.

- [189] Le prix Nobel de chimie 2015 - Nouvelle de l'INSERM - [www.inserm.fr/home](http://www.inserm.fr/home)
- [190] Houtgraaf JHet al. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jul-Sep;7(3):165-72.
- [191] Ciccia A et al. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010 Oct 22 ;40(2):179-204..
- [192] Branzel D. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks DNA Repair (Amst). 2007 Jul 1;6(7):994-1003. Epub 2007 Mar 26.
- [193] Ziv Yet al. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):870-6. Epub 2006 Jul 23.
- [194] Collis SJet al. Emerging links between the biological clock and the DNA damage response. *Chromosoma*. 2007 Aug;116(4):331-9. Epub 2007 May 11.
- [195] J. Wade Harper The DNA Damage Response: Ten Years After Molecular Cell Volume 28, Issue 5, 14 December 2007, Pages 739-745
- [196] Reinhardt HC et al. P53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage *Cancer Cell*. 2007 Feb ;11(2):175-89.
- [197] Stokes MP et al. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 11 ;104(50):19855-60. Epub 2007 Dec 6.
- [198] Henrik Daub. Damage Response: Multilevel Proteomics Gains Momentum. *Molecular Cell Volume 46, Issue 2, p113–114, 27 April 2012*
- [199] Lempiäinen Het al. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*. 2009 Oct 21 ;28(20) :3067-73. doi: 10.1038/emboj.2009.281. Epub 2009 Sep 24.
- [200] Bakkenist CJ et al. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30 ;421(6922) :499-506.
- [201] Lee JH et al. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005 Apr 22 ;308(5721) :551-4. Epub 2005 Mar 24.
- [202] Kang S et al. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18 ;102(3) :802-7. Epub 2005 Jan 12.
- [203] Chehab NHet al. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*. 2000 Feb 1 ;14(3) :278-88.
- [204] Smith J. et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer.*Adv Cancer Res*. 2010 ;108 :73-112. doi: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0.
- [205] Tessitore A et al. MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer.*Int J Genomics*. 2014 ;2014 :820248. doi: 10.1155/2014/820248. Epub 2014 Jan 30.
- [206] Wan Y et al. Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nat Rev Genet*. 2011 Aug 18 ;12(9) :641-55. doi: 10.1038/nrg3049.

- [207] Guohui Wan et al. A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation. *The EMBO Journal* (2013) 32, 2833-2847
- [208] Takubo K et al. Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of Atm-null testis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006 Dec 29 ;351(4):993-8
- [209] Xu Y, DNA damage : a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis, *Nature Reviews Immunology* 6, 261-270
- [210] Teive HA et al. Ataxia-telangiectasia - A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome *J Neurol Sci.* 2015 Aug 15 ;355(1-2) :3-6. doi: 10.1016/j.jns.2015.05.022. Epub 2015 May 29.
- [211] McBride KA et al. Li-Fraumeni syndrome : cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 May ;11(5):260-71. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.41. Epub 2014 Mar 18
- [212] Cortez D. et al. ATR and ATRIP : partners in checkpoint signaling. *Science.* 2001 Nov 23 ;294(5547):1713-6.
- [213] Gillian G Jones et al. The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes *Oncogene* (2004) 23, 1911–1921 (11 March 2004)
- [214] Alexandre Maréchal et al. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases *s Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013 ;5 : a012716
- [215] Bartek J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* 2003 May ;3(5) :421-9.
- [216] Liu et al. BID Binds to Replication Protein A and Stimulates ATR Function following Replicative Stress, *Molecular and Cellular Biology* 31(21):4298-309
- [217] Tomimatsu N, Mukherjee B, Burma S. Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Reports.* 2009 ;10(6):629-635.
- [218] Stiff T al. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *The EMBO Journal.* 2006 ;25(24):5775-5782.
- [219] Chanoux RA et al. ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27 ;284(9):5994-6003.
- [220] Van der Burg M et al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest.* 2009 Jan;119(1):91-8. doi: 10.1172/JCI37141. Epub 2008 Dec 15.
- [221] Felici R, et al. PARP Inhibition Delays Progression of Mitochondrial Encephalopathy in Mice. *Neurotherapeutics.* 2014;11(3):651-664.
- [222] Caldecott KW et al. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst).* 2007 Apr 1;6(4):443-53. Epub 2006 Nov 21.
- [223] Nicolas Le May et al. NER factors are recruited to the promoters of activated genes and help cRHomatin modifications for efficient transcription in the absence of exogenous genotoxic attack ; *Molecular Cell*, Avril 2010

- [224] Philippe Pourquier, La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie Volume 93, supplément 4, Numéro hors-série, Avril 2006
- [225] Marteijn JA Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jul ;15(7):465-81. doi: 10.1038/nrm3822.
- [226] Jiricny J et al. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 May ;7(5):335-46.
- [227] Anne Bothmer et al. 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. Journal of Experimental Medicine December 4, 2017 Volume 214, No. 12
- [228] Sfeir A. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? Trends Biochem Sci. 2015 Nov ;40(11):701-14doi:10.1016/j.tibs.
- [229] Davis AJ et al. DNA-PK : a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. DNA Repair (Amst). 2014 May ;17 :21-9. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.02.020. Epub 2014 Mar 27.
- [230] Rass E et al. Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining. Cancer Radiother. 2012 Feb ;16(1):1-10. [231] Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS. Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process ? Jinks-Robertson S, ed. PLoS Genetics. 2014 ;10(1): e1004086.
- [232] Robert et al. Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination Journal of Experimental Medicine December 4, 2017 Volume 214, No. 12
- [233] Malu S et al. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. Immunol Res. 2012 Dec ;54(1-3) :233-46.
- [234] Kerzendorfer et al. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes : Linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency". DNA Repair (Amst.). 8 (9): 1139–52
- [235] Konstantinopoulos PA et al. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer.Cancer Discov. 2015 Nov ;5(11):1137-54. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0714. Epub 2015 Oct 13.
- [236] Dora Papadopoulo et Ethel Moustacchi FANCD1 et BRCA2, un seul et même gène ? Med Sci (Paris) Volume 18, Number 11, Novembre 2002 P.1058 – 1061
- [237] Mao Z et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells Cell Cycle. 2008 Sep 15 ;7(18):2902-6.
- [238] Mao Z et al. DNA Repair (Amst). 2008 Oct 1 ;7(10):1765-71. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018. Epub 2008 Aug 20. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells.
- [239] Huertas P et al. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. J Biol Chem. 2009 Apr 3;284(14):9558-65. doi: 10.1074/jbc.M808906200. Epub 2009 Feb 7.
- [240] Tan DS et al. Implications of BRCA1 and BRCA2 mutations for the efficacy of paclitaxel monotherapy in advanced ovarian cancer. Eur J Cancer. 2013 Apr ;49(6):1246-53. doi: 10.1016/j.ejca.2012.11.016. Epub 2012 Dec 19.



- [241] Monika E et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma *N Engl J Med* 2005 ; 352 :997-1003 March 10, 2005 DOI: 10.1056/NEJMoa043331
- [242] Jie Shen et al. A three-gene signature as potential predictive biomarker for irinotecan sensitivity in gastric cancer *Journal of Translational Medicine* 2013, 11:73
- [243] DB Longley et al. Molecular mechanisms of drug resistance *Authors J Pathol.* 2005 Jan ;205(2) :275-92.
- [244] Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct ;6(10) :789-802.
- [245] Alagoz M et al. DNA repair and resistance to topoisomerase I inhibitors: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2012 ;19(23):3874-85.
- [246] Yves Pommier et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) DNA Repair (Amst). 2014 July ; 19 : 114–129
- [247] Aebi S et al. Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. *Cancer Research.* 1996 ;56(13):3087-90.
- [248] Jackson SP et al. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 Oct 22 ;461(7267):1071-8. doi: 10.1038/nature08467.
- [249] Curtin, N.J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* 12, 801–817.
- [250] Mark J. O'Connor et al. Targeting the DNA Damage Response in Cancer, *Molecular Cell* Volume 60, Issue 4, p547–560, 19 November 2015
- [251] Ashworth, A. et al. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribos polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J. Clin. Oncol.* 26, 3785–3790.
- [252] Dietlein F et al. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet.* 2014 Aug ;30(8):326-39. doi: 10.1016/j.tig.2014.06.003. Epub 2014 Jul 10.
- [253] Dobbela, M., and Sørensen, C.S. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 405–423.
- [254] Jun Zhang et al. Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy *Genes (Basel).* 2016 Aug; 7(8): 51.
- [255] Buisson, R., et al. (2015). Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Mol. Cell* 59, 1011–1024.
- [256] Rohban, S., and Campaner, S. (2015). Myc induced replicative stress response: How to cope with it and exploit it. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 517–524.
- [257] Lukas, C et al. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.
- [258] Friedman LS et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet.* 1994 Dec ;8(4):399-404.
- [259] Moslehi R et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2000 Apr ;66(4) :1259-72. Epub 2000 Mar 16.

- [260] Gorrini C et al. Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K-NRF2-regulated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 25 ;111(12) :4472-7. Epub 2014 Feb
- [261] Malcolm A. Smith et al. Synergistic Activity of PARP Inhibition by Talazoparib (BMN 673) with Temozolomide in Pediatric Cancer Models in the Pediatric Preclinical Testing Program. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 15; 21(4): 819–832.
- [262] Helleday, T. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol. Oncol.* 5, 387–393.
- [263] Murai, J., Huang, S.Y., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 72, 5588–5599.
- [264] Amy Dréan et al. PARP inhibitor combination therapy *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 108 (2016) 73–85
- [265] Middleton, M.R., et al., 2015. Randomized phase II study evaluating veliparib (ABT-888) with temozolomide in patients with metastatic melanoma. *Ann. Oncol.* 26 (10), 2173–2179.
- [266] O'Connor, M.J. et al. Generating preclinical models to assess bone marrow toxicity induced by the PARP inhibitor olaparib in combination with chemotherapy. *Cancer Res.* 7
- [267] Weiss, G.J. et al. First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101, a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies. *Invest. New Drugs* 31, 986–1000.
- [268] Young, C. et al. CRLX101 (formerly IT-101)-A Novel Nanopharmaceutical of Camptothecin in Clinical Development. *Curr. Bioact. Compd.* 7, 8–14.
- [269] Everett J. Moding Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation *Nat Rev Drug Discov.* 2013 July ; 12(7): 526–542
- [270] Notion en Radiobiologie, [www.oncoprof.net](http://www.oncoprof.net) par Paul Léonard.
- [271] R. J. Flassig et al. Experimental design, validation and computational modeling uncover DNA damage sensing by DNA-PK and ATM *Mol. Biosyst.*, 2014, 10, 1978
- [272] Leahy JJ Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 Dec 20 ;14(24):6083-7
- [273] Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004, 432, 298–306.
- [274] Hartwell, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992, 71, 543–546
- [275] Wu, X. ; Shell, S.M. ; Liu, Y.; Zou, Y. ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* 2007, 26, 757–764
- [276] Morgan, M.A. ; et al. Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res.* 2010, 70, 4972–4981.
- [277] Cliby, W.A et al. S Phase and G2 Arrests Induced by Topoisomerase I Poisons Are Dependent on ATR Kinase Function. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 1599–1606.

- [278] Nghiem, P et al. ATR inhibition selectively sensitizes G(1) checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 9092–909
- [279] Ganzinelli, M. et al. Checkpoint Kinase 1 Down-Regulation by an Inducible Small Interfering RNA Expression System Sensitized in vivo Tumors to Treatment with 5-Fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 5131. [
- [280] Pan, Y et al. Knockdown of Chk1 sensitizes human colon carcinoma HCT116 cells in a p53-dependent manner to lidamycin through abrogation of a G2/M checkpoint and induction of apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 2009, 8, 1559–1566
- [281] Azorsa, D.O et al. Synthetic lethal RNAi screening identifies sensitizing targets for gemcitabine therapy in pancreatic cancer. *J. Transl. Med.* 2009, 7, 43
- [282] Wagner, J.M et al. Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival. *Mol. Pharmacol.* 2009, 76, 208
- [283] Toledo, L.I. et al. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18, 721–727
- [284] Peasland, A et al. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 2011, 105, 372–381.
- [285] Charrier, J.D et al. Discovery of potent and selective inhibitors of ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 2320–2330.
- [286] Stuart Rundle, et al. Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy *Cancers (Basel)*. 2017 May ; 9(5) : 41.
- [287] Michael G. Kemp et al. ATR Kinase Inhibition Protects Non-cycling Cells from the Lethal Effects of DNA Damage and Transcription Stress *J Biol Chem.* 2016 Apr 22 ; 291(17): 9330–9342.
- [288] Hall, A.B et al. Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. *Oncotarget* 2014, 5, 5674–5685
- [289] Reaper, P.M et al. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem. Biol.* 2011, 7, 428–430
- [290] Josse, R. et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase i inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* 2014, 74, 6968–6979.
- [291] Huntoon, C.J et al. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* 2013, 73, 3683–3691
- [292] Pires, I.M.et al. Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *Br. J. Cancer* 2012, 107, 291–299.

### **PARTIE III: DÉVELOPPEMENT DU PREMIER INHIBITEUR DE LA PROTÉINE ATR : LE VX-970**

- [293] Ruth Plummer et al. Phase 1 Trial of First-in-Class ATR Inhibitor VX-970 in Combination With Gemcitabine in Advanced Solid Tumors (NCT02157792) – Poster n°2013

# ANNEXE I

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1	Liste des 50 TC disponibles autorisées (AMM + ATU) dans le traitement du cancer en 2017	p21
TABLEAU 2	Nombre d'indications thérapeutiques autorisées (AMM ou ATU de cohorte) pour les thérapies ciblées	p24
TABLEAU 3	Classification des TC en fonction de la voie oncogénique mise en jeux	p26
TABLEAU 4	Classification historique des anticancéreux	p32
TABLEAU 5	Classification des anticancéreux établie par l'InCa	p34
TABLEAU 6	Classification des anticancéreux établie par Espinosa et al.	p36
TABLEAU 7	Proposition d'une classification	p38
TABLEAU 8	Résultats de l'étude AVOREN	
TABLEAU 9	Résultats des études de phase III	p47
TABLEAU 10	Résultats des études de phase III	p48
TABLEAU 11	Essais de phase III ayant évalué, en comparaison de la chimiothérapie, les 3 principaux ITK en première ligne dans une population de patients mutés EGFR.	p53
TABLEAU 12	Mécanisme génétique de la pharmacorésistance des TC les plus couramment utilisés en clinique	p62
TABLEAU 13	Mécanisme non-génétique de la pharmacorésistance des quelques TC	P67
TABLEAU 14	Les effets indésirables nécessitant un arrêt thérapeutique sous TC	P74
TABLEAU 15	Les spécialités de l'immunothérapie spécifique disponible dans le traitement du cancer en 2017 et les indications de leurs AMM respectives	p83
TABLEAU 16	Bilan des essais cliniques de phase III des agents de l'immunothérapie spécifique enregistrés à partir du 1er janvier 2017 sur la base <i>clinicaltrials.org</i>	p88
TABLEAU 17	Lien théorique des mécanismes de réparations sollicités par les dommages de l'ADN chimio-induits	p142

TABLEAU 18	Les inhibiteurs sélectifs de la protéine ATR (ATRi)	p156
TABLEAU 19	La DLT est survenue chez 4 patients	p163
TABLEAU 20	Études ouvertes et à recrutement actif évaluant le VX-970 en 2016	p172

## LISTES DES FIGURES

FIGURE 1	Part des thérapies ciblées dans l'arsenal thérapeutique autorisé dans le cancer	p22
FIGURE 2	Nombre d'AMM initiales octroyées pour des TC injectables (AMM TC inj) ou des TC par voie orale (AMM TC per os) entre 2000 et 2015, rapporté par tranches de 4 années	p23
FIGURE 3	Nombre de thérapies ciblées différentes ayant au moins une indication dans chaque localisation tumorale	p28
FIGURE 4	Modalités d'utilisation des TC, en monothérapie ou en association, selon leurs indications thérapeutiques	p30
FIGURE 5	Moment d'utilisation des thérapies ciblées, en fonction du stade de la maladie, conformément à leurs indications thérapeutiques	p31
FIGURE 6	Rôle du gène VHL dans la réponse tissulaire à l'hypoxie en présence d'oxygène, en absence d'oxygène et en cas de mutation du gène VHL	P45
FIGURE 7	Pourcentages des anomalies moléculaires détectées dans le CBNPC par l'étude Biomarqueurs France	p50
FIGURE 8	Survie sans progression avec le vémurafenib ou la dacarbazine dans l'étude BRIM III	p57
FIGURE 9	Evolution des montants des ventes annuelles de médicaments anticancéreux en ville et à l'hôpital en millions d'euros sur la période 2012-2014	p77
FIGURE 10	Dépenses liées aux thérapies ciblées de la liste en sus dans le secteur hospitalier en 2014	p78
FIGURE 11	Dépenses liées aux thérapies ciblées dispensées en officine en 2014	p79

FIGURE 12	Paramètres de recherche sur la base de données <i>clinicaltrials.gov</i>	p85
FIGURE 13	Schéma simplifié de l'emploi des CAR-T	p89
FIGURE 14	Exemples des différents types de dommages à l'ADN	P98
FIGURE 15	L'intégration des processus cellulaires coordonnés par la DDR	p100
FIGURE 16	Organisation de la DDR	p101
FIGURE 17	La voie ATM	p104
FIGURE 18	Régulation de la voie ATM	p105
FIGURE 19	La voie ATR	p107
FIGURE 20	Relation ATR/ATM	p111
FIGURE 21	Les deux voies du système de réparation BER	p115
FIGURE 22	Le système de réparation NER	p116
FIGURE 23	Activation des mécanismes de réparations des CDBs	p119
FIGURE 24	La réparation des dommages double brin de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues classique	P121
FIGURE 25	La réparation des dommages double brin de l'ADN par la voie MMEJ	p123
FIGURE 26	Mise en place de la RH	p126
FIGURE 27	La réparation des dommages double brin de l'ADN par RH	p127
FIGURE 28	Les mécanismes de réparations doubles brins en fonction de la phase du cycle cellulaire	p129
FIGURE 29	Les maladies congénitales liées aux mutations des différents acteurs de la DDR	p130
FIGURE 30	Mécanisme de létalité synthétique	p135
FIGURE 31	Les 3 points clés qui justifient le ciblage de la DDR	p138
FIGURE 32	Application de stratégie de létalité synthétique chez les cellules déficientes BRCA 1 /2 par l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine PARP-1	p140
FIGURE 33	Modèle du réseau de voies de signalisations de la DDR	P146

FIGURE 34	Simulation OED-0 : enregistrement des variations des $\gamma$ H2AX au cours de temps pour 5 régimes de dose	p148
FIGURE 35	Simulation OED-1 : enregistrement de la variation des $\gamma$ H2AX au cours de temps	p149
FIGURE 36	Simulation OED-2 : enregistrements des variations des $\gamma$ H2AX au cours de temps	p150
FIGURE 37	La variation des concentrations de DNA-PK et d'ATM au cours de temps suit celles des histones $\gamma$ H2AX	p151
FIGURE 38	Enregistrements des variations des $\gamma$ H2AX au cours de temps par exposition de doses croissantes. Simulations d'inhibitions d'ATM et de DNA-PK selon 3 modes	P152
FIGURE 39	Réponse tumorale du traitement VX-970 + gemcitabine	p164
FIGURE 40	Logarithme des profils cinétique du VX-970 associé à la gemcitabine	p165
FIGURE 41	Digitalisation des profils cinétiques en observations temps/concentration	p167
FIGURE 42	Représentation d'un modèle à 2 compartiments	p167
FIGURE 43	« Fits » individuels	p169
FIGURE 44	Observations vs. Prédictions	p170
FIGURE 45	VPC pour <i>Visual Predictive Check</i>	p170
FIGURE 46	Structure chimique du VX-970	p173
FIGURE 47	L'étalon interne [d <sub>7</sub> ]-VX-970	p175
FIGURE 48	Le gradient des solvants pompés en pourcentages en fonction du temps	p176
FIGURE 49	Le débit des solvants pompés en fonction du temps par cycle d'analyse	p176



## Short communication

## LC–MS/MS assay for the quantitation of the ATR kinase inhibitor VX-970 in human plasma



Brian F. Kiesel<sup>a,b</sup>, Jonas Scemama<sup>a,c</sup>, Robert A. Parise<sup>a</sup>, Liza Villaruz<sup>a,d</sup>, Andre Iffland<sup>e</sup>, Austin Doyle<sup>f</sup>, Percy Ivy<sup>f</sup>, Edward Chu<sup>a,d</sup>, Christopher J. Bakkenist<sup>g,h</sup>, Jan H. Beumer<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Cancer Therapeutics Program, University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA, USA

<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

<sup>c</sup> Aix-Marseille University, Faculty of Pharmacy, Pharmacokinetics, Toxicokinetics Department, Marseille, France

<sup>d</sup> Division of Hematology-Oncology, Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

<sup>e</sup> Vertex Pharmaceuticals, Preclinical Safety Assessment-Bioanalysis, Boston, MA, USA

<sup>f</sup> Investigational Drug Branch, Cancer Therapy Evaluation Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

<sup>g</sup> Department of Radiation Oncology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

<sup>h</sup> Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 July 2017

Received in revised form 21 August 2017

Accepted 28 August 2017

Available online 31 August 2017

## Keywords:

VX-970

Tandem mass spectrometry

Clinical

## ABSTRACT

DNA damaging chemotherapy and radiation are widely used standard-of-care modalities for the treatment of cancer. Nevertheless, the outcome for many patients remains poor and this may be attributed, at least in part, to highly effective DNA repair mechanisms. Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR) is a key regulator of the DNA-damage response (DDR) that orchestrates the repair of damaged replication forks. ATR is a serine/threonine protein kinase and ATR kinase inhibitors potentiate chemotherapy and radiation. The ATR kinase inhibitor VX-970 (NSC 780162) is in clinical development in combination with primary cytotoxic agents and as a monotherapy for tumors harboring specific mutations. We have developed and validated an LC–MS/MS assay for the sensitive, accurate and precise quantitation of VX-970 in human plasma. A dilute-and-shoot method was used to precipitate proteins followed by chromatographic separation with a Phenomenex Polar-RP 80 Å (4 μm, 50 × 2 mm) column and a gradient acetonitrile–water mobile phase containing 0.1% formic acid from a 50 μL sample volume. Detection was achieved using an API 4000 mass spectrometer using electrospray positive ionization mode. The assay was linear from 3 to 5,000 ng/mL, proved to be accurate (94.6–104.2%) and precise (<8.4% CV), and fulfilled criteria from the FDA guidance for bioanalytical method validation. This LC–MS/MS assay will be a crucial tool in defining the clinical pharmacokinetics and pharmacology of VX-970 as it progresses through clinical development.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cytotoxic chemotherapies and ionizing radiation that induce DNA damage are widely used standard-of-care modalities for solid malignancies. For many patients the benefit of these therapies is limited, at least in part, by the DNA damage response (DDR), the signaling that orchestrates a wide array of mechanisms that detect and repair DNA damage in cancer cells as well as normal cells [1].

Cancer cells frequently acquire mutations that inactivate specific DNA repair mechanisms and these changes that are not present in normal cells, may be exploited to achieve significant therapeutic index with small molecules such as PARP inhibitors. Furthermore, the DDR may be a barrier to oncogenic transformation that may be elevated in cancer cells and therefore targeted to achieve significant therapeutic index [2].

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR) are two serine/threonine kinases that have been identified as primary activators and coordinators of DDR [3,4]. ATM recognizes DNA double-strand breaks (DSBs) and ATR recognizes single-strand DNA at damaged replication forks and resected (DSBs) [1]. ATM and ATR initiate complex and overlapping

\* Corresponding author at: University of Pittsburgh Cancer Institute, Room G27E, Hillman Research Pavilion, 5117 Centre Avenue, Pittsburgh, PA 15213-1863, USA.  
E-mail address: [beumerj@gmail.com](mailto:beumerj@gmail.com) (J.H. Beumer).



signaling cascades [5]. Up to 70% of tumors display inactivating mutations in either ATM or tumor suppressor protein p53 and it is hypothesized that cells harboring defects in this signaling axis acquire a selective advantage during carcinogenesis that is associated with loss of the G1 cell cycle checkpoint and reduced DNA repair [6]. Cancer cells that have lost the ATM/p53 axis have an increased dependence on the ATR signaling pathway and correspondingly both ATM- and p53-deficient cancer cells are selectively killed by ATR kinase inhibitors *in vitro* and *in vivo* [7–9].

VX-970 has recently entered clinical development as a potent and selective inhibitor of ATR [10]. VX-970 has anti-proliferative qualities as a single agent and it potentiates the effects of DNA damaging therapies in ATM-deficient xenograft models [11–13]. Radiation and chemotherapy are typically administered at or near their maximum tolerable dose and potentiating these standard-of-care therapies with VX-970 is a rational approach to increase the efficacy of the primary DNA damaging modality without creating additional toxicity. As VX-970 progresses through clinical development, an accurate description of its pharmacokinetics and potential alterations by primary chemotherapies is crucial. To support these endeavors we developed a sensitive and accurate LC–MS/MS assay to quantify VX-970 in human plasma. The calibration curve ranges from 3 to 5000 ng/mL to accommodate expected clinical concentrations.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

VX-970 (NSC 780162, VRT-0768079, VE-822) ( $M/(M+M_{+7}) > 99.99\%$ ) was obtained from Vertex Pharmaceuticals (Boston, MA) as the free base. Because the drug substance used clinically, and therefore the reported doses, reflect the hydrochloride salt, all concentrations described in this report are expressed as hydrochloride salt. The internal standard,  $[d_7]$ -VX-970 (VRT-1135046) ( $M_{+7}/(M+M_{+7}) > 99.66\%$ ), was obtained from Vertex Pharmaceuticals (Boston, MA). Bile from VX-970 treated rat was provided by Vertex Pharmaceuticals, London, UK. Acetonitrile, water (both HPLC grade) and dimethyl sulfoxide were purchased from Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Formic acid was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Control human plasma was purchased from Valley Biomedical (Winchester, VA) and Lampire (Everett, PA). Bovine serum albumin (BSA), pooled human liver microsomes, pooled female rat microsomes, UDPGA,  $MgCl_2$ , alame-thicin and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### 2.2. Chromatography

The LC system consisted of an Agilent (Palo Alto, CA, USA) 1200 SL autosampler and binary pump and a Phenomenex (Torrence, CA USA) Synergi Polar-RP 80 Å (4  $\mu$ m, 50  $\times$  2.0 mm) column using a gradient style elution program. Mobile phase solvent A consisted of 0.1% formic acid in acetonitrile and mobile phase solvent B consisted of 0.1% formic acid in water. The initial mobile phase composition was 30% solvent A and 70% solvent B. From 0 to 2.2 min, at a 0.4 mL/min flowrate, solvent A was increased to 80% and conditions held until 2.3 min. Between 2.3 and 3.0 min, solvent A was maintained at 80% and the flowrate increased to 0.8 mL/min and conditions held until 3.1 min. At 3.1 min the mobile phase composition was then returned to 30% solvent A until 4 min at a flowrate of 1.0 mL/min. The total run time was 4 min with an injection volume of 5  $\mu$ L.

### 2.3. Mass spectrometry

Mass spectrometric detection was carried out using a SCIEX (Framingham, MA) 4000 hybrid linear ion trap tandem mass spectrometer utilizing electrospray ionization in positive-ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The settings of the mass spectrometer in positive mode scanning parameters were as follows: curtain gas 40, IS voltage 5000 V, probe temperature 500 °C, GS1 65, GS2 65, DP 50 V, CE of 25 eV, and an exit potential of 10 V. The temperature of the autosampler was 4 °C. The MRM  $m/z$  transitions monitored were: 464.3 > 433.5 for VX-970 and 471.3 > 440.3 for  $[d_7]$ -VX-970. Control of the LC system and mass spectrometer as well as data collection was accomplished with Analyst software (version 1.4.2).

### 2.4. Preparation of calibration standards and quality control samples

Stock solutions of VX-970 and internal standard  $[d_7]$ -VX-970 (see Fig. 1 for structures) were prepared independently at 1.0 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at –80 °C. Working stock solutions of 0.1 mg/mL VX-970 and 0.1 mg/mL  $[d_7]$ -VX-970 were prepared in DMSO. On the days of analysis, the working stock solution of VX-970 was serially diluted in 10 fold steps using DMSO, and the internal standard was diluted 200 fold to a final concentration of 0.5  $\mu$ g/mL. VX-970 calibration working stock solutions were then diluted in human plasma to produce the following analyte concentrations: 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 and 5000 ng/mL. For each calibration series zero and blank samples were also prepared from 50  $\mu$ L of control plasma.

Quality control (QC) stock solutions were stored at –80 °C. These solutions were diluted in human plasma to produce the following QC samples of either: Lower Limit of Quantification (LLOQ) 3 ng/mL, QC Low (QCL) 5 ng/mL; QC Mid (QCM) 150 ng/mL, and QC High (QCH) 4000 ng/mL.

### 2.5. Sample preparation

Ten  $\mu$ L of 0.5  $\mu$ g/mL  $[d_7]$ -VX-970 was added to each micro-centrifuge tube except blank plasma samples. This was followed by addition 50  $\mu$ L plasma (standard, QC or sample plasma). Protein precipitation was sequentially accomplished using 200  $\mu$ L of acetonitrile (aqueous to organic ratio of 1:4 v/v). Samples were vortexed for 1 min on a Vortex Genie-2 set at 9 (Model G-560 Scientific Industries, Bohemia, NY) and then centrifuged at 13,500  $\times$  g at room temperature for 5 min. A 100  $\mu$ L aliquot of the resulting supernatant was transferred to an autosampler vial followed by addition of 150  $\mu$ L of water (final organic composition 32%), vial capping and brief vortexing. A 5  $\mu$ L volume of each sample was then injected into the LC–MS/MS system.

### 2.6. Validation procedures

#### 2.6.1. Calibration curve and lower limit of quantitation (LLOQ)

Calibration standards and blanks were prepared and analyzed (see paragraph 2.3 and 2.4) in triplicate to establish a calibration range with acceptable accuracy and precision, as previously described [14].

#### 2.6.2. Accuracy and precision

The accuracy and precision of the assay were determined by analyzing samples at the LLOQ, QCL, QCM, and QCH concentrations, as previously described [14].

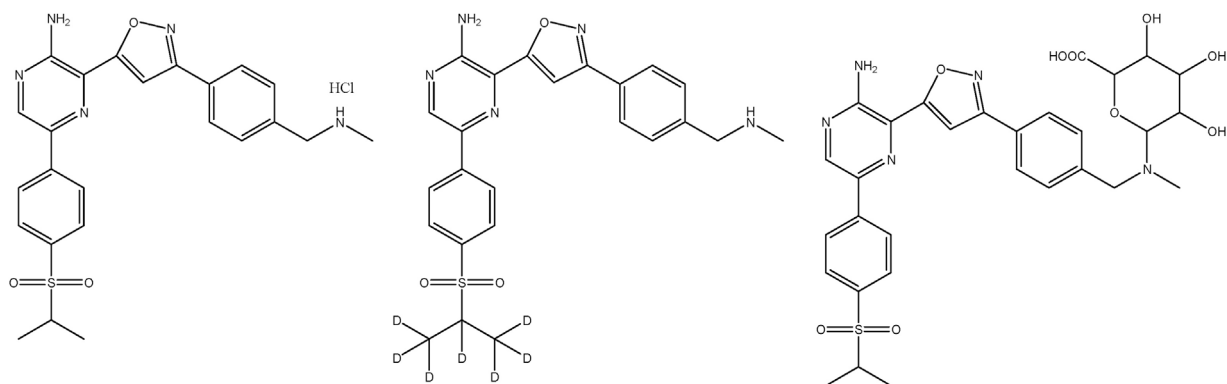


Fig. 1. Structures of VX-970 (HCl salt), [d<sub>7</sub>]-VX-970 internal standard, and VX-970 glucuronide metabolite.

### 2.6.3. Selectivity and specificity

Six individual batches of control drug-free human plasma were processed and analyzed (see 2.4) to investigate potential interference of endogenous matrix components with the assay. Responses of VX-970 at the LLOQ concentration were compared with the response of the blank samples.

Cross-talk of VX-970 and [d<sub>7</sub>]-VX-970 was characterized by detection of competing analyte signal into their respective MRM channels.

### 2.6.4. Extraction recovery and matrix effect

We determined the extraction recovery of VX-970 from plasma by comparing the absolute response of a neat solution of VX-970 in an extracted control plasma sample to the absolute response of a plasma extract with an equal amount of VX-970 added prior to extraction.

Regions of potential matrix effects on analyte signal by endogenous phospholipids in human plasma were identified by characterizing the chromatographic profiles of phospholipids. This was accomplished using previously reported phospholipid MRM channels and MS settings while maintaining the optimized LC components of the VX-970 assay [15,16]. The following MRM channels were monitored in addition to VX-970:  $m/z$  184 > 184, 496 > 184, 522 > 184, 524 > 184, 704 > 184, 758 > 184, 760 > 184, 784 > 184, 806 > 184. Trimethylammonium-ethyl phosphate ( $m/z$  184) is a common phospholipid product ion found in human plasma.

The matrix effect caused by endogenous plasma matrix components on VX-970 response was defined as the change in the absolute response of a control plasma extract to which analyte had been added after the extraction relative to the absolute response of reconstitution solvent to which the same amount of VX-970 had been added. Experiments were performed at the three QC concentrations in quadruplicate.

### 2.6.5. Stability

Long-term stability experiments were performed both in stock solution and plasma after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Stability in the stock solution was expressed as the percentage recovery from a freshly prepared solution relative to the stored solution (8 months). The stability of VX-970 in plasma at  $-80^{\circ}\text{C}$  was determined by comparison of plasma samples before and after storage (8 months) against freshly prepared standard curves.

The room temperature stability of VX-970 in stock solution for 6 h was determined by comparison to stock solution stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All stability testing in plasma was performed in triplicate at the QCL, QCM and QCH concentrations. The effect of 3 freeze/thaw cycles on VX-970 concentrations in plasma was evaluated by analysis of sample after they had been frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and thawed on 3 separate days and comparing the results with those of freshly

prepared samples. The stability of VX-970 in plasma during sample preparation was evaluated by assaying samples before and after 4 h of storage at room temperature. To evaluate the stability of VX-970 after sample processing, we re-injected QC samples and calibration curves approximately 72 h after the first injection. The concentrations and absolute analyte areas derived from the second injection were then compared with those derived from the first injection. The results were expressed as a percentage of the values of the second run to their respective values in the first run.

### 2.6.6. Dilution integrity

To demonstrate dilution integrity, plasma samples containing VX-970 concentrations of 50,000 ng/mL were diluted 20-fold (to 2500 ng/mL) with control plasma and analyzed.

### 2.6.7. Anti-coagulantia cross validation

To demonstrate the ability of our EDTA plasma-based assay to quantitate heparinized plasma samples, we quantitated and compared our EDTA QCL, QCM, and QCH samples in quadruplicate against both an EDTA and a heparinized plasma duplicate calibration curve.

### 2.6.8. Glucuronide metabolite

This method was developed for the quantitation of VX-970 in samples obtained from multiple clinical trials. In preclinical animal testing, the major metabolite of VX-970 was identified as a direct glucuronide conjugate of VX-970 (mass 638.5 amu). In anticipation of possible glucuronide metabolites in plasma of treated with VX-970, we examined bile from a rat that was administered VX-970 (M. Howard, Vertex Pharmaceuticals London UK, estimated concentrations based on HPLC-UV: 9.0  $\mu\text{g/mL}$  VX-970, 31.9  $\mu\text{g/mL}$  VX-970 glucuronide).

We first determined the retention time of the glucuronide metabolite in our assay. To accomplish this we first spiked bile from VX-970 treated rats (10 mg/kg IV infusion) to control plasma and processed these samples as described previously. A full mass scan of this sample was analyzed to identify the glucuronide metabolite (+176  $m/z$ ). The sample was then re-injected using a product ion scan to determine the fragmentation pattern of the metabolite. This revealed the metabolite fragmented into both VX-970 parent mass (464.3  $m/z$ ) as well as the previously selected VX-970 product ion (433.5  $m/z$ ). Based on signal intensity, the 433.5  $m/z$  product ion was selected and a 639.5 > 433.5  $m/z$  MRM channel was added to the method to monitor the metabolite.

Chemical degradation in matrix and in-source fragmentation can cause cleavage of direct glucuronide metabolites, producing parent drug, causing false positive parent compound signal. Potential VX-970 interference from in-source fragmentation of the glucuronide metabolite was assessed by comparison of parent and

metabolite retention times. The stability of glucuronide metabolite in human plasma was assessed by taking bile from VX-970 treated mice and spiking it to human plasma. These samples were then analyzed before and after a 4 h incubation at room temperature. The stability of the metabolite as a function of pH was also assessed by spiking the bile to phosphate buffers at various pH values (5, 6, 7, 8 and 9). VX-970 was quantitated before and after a 4 h incubation at room temperature in these buffers.

To further elucidate the role of VX-970 glucuronidation as a pathway in human metabolism, separate incubations of VX-970 in permeabilized human and rat microsomes were conducted in triplicate. The incubation for glucuronidation was adapted from a previously published method to allow for a 0.5 mL incubation volume [17]. The final incubation mixture contained 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.25 mg/mL microsomal protein concentration, 25  $\mu$ g/mL alamethicin, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5000 ng/mL of VX-970. Determination of microsome protein content was accomplished using a protein assay kit from BioRad (Hercules, CA) with BSA as the standard. Absorbance readings were recorded at 630 nm using an Infinite M100 Pro plate reader from Tecan (Männedorf, Switzerland). The reaction was initiated with the addition of 5  $\mu$ M UPDGA. Aliquots (50  $\mu$ L) were sampled from the reaction mixture at 0 and 60 min with 200  $\mu$ L of acetonitrile added to terminate the reaction. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the day of analysis upon which 10  $\mu$ L of internal standard was added and samples processed as described previously. Samples were quantitated with a standard curve produced in phosphate buffer matrix (pH 7.4) with 0.25 mg/mL BSA along with QCs prepared in human plasma. The validity of the assay in this matrix was first validated by preparing a triplicate curve in the matrix and comparing it to QCs prepared in plasma. A negative control was included that lacked UPDGA in a rat microsome incubation. Positive controls were included using SN-38 (active metabolite of irinotecan) in separate human and rat microsome incubations. SN-38 and SN-38 glucuronide were analyzed by LC–MS/MS based on a previously published assay [18].

## 2.7. Application of assay

To demonstrate the applicability of the assay, we analyzed samples from a patient enrolled in the study of VX-970 in combination with irinotecan (NCT02595931). This patient had signed informed consent on an institutional review board approved protocol. The patient received an IV infusion of VX-970 and blood samples were collected between 0 and 72 h. The pharmacokinetic parameters from this patient were determined non-compartmentally using PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Montrose, CO). Additionally, the glucuronide metabolite channel was also monitored during sample analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Assay validation

#### 3.1.1. Calibration curve and LLOQ

The selected assay range of 3–5,000 ng/mL fulfilled the FDA criteria for the LLOQ concentration and the calibration curve [19]. Accuracies and precisions at the different concentrations were determined from triplicate calibration curves on 5 separate days and are reported in Table S 1. At most concentrations, the mean square of the within runs was greater than the mean square of the between runs, indicating that there was no significant additional variability due to the performance of the assay in different runs [20]. Representative calibration curves and corresponding correlation and regression coefficients are shown in Fig. S. 1.

#### 3.1.2. Accuracy and precision

The accuracies and intra- and inter-assay precisions for the tested concentrations (LLOQ, QCL, QCM, and QCH) were all within the defined acceptance criteria (Table S 2) [19].

#### 3.1.3. Selectivity and specificity

Chromatograms of six individual control plasma samples contained no co-eluting peaks >20% of the analyte areas at the LLOQ concentration.

Cross-talk calculations were performed and revealed that VX-970 cross-talks with the internal standard channel at approximately 0.0015% with identical retention times. The internal standard is added at approximately 50 ng/mL, which would not be expected to result in meaningful interference with the VX-970 signal at the LLOQ at 3 ng/mL.

#### 3.1.4. Extraction recovery and matrix effect

The recovery of VX-970 was approximately 94% with CVs between 2.7 and 11.8%.

Analysis of phospholipid MRM channels demonstrated no phospholipids co-elute with VX-970 (Fig. S. 3). Matrix effect was less than  $-7\%$  (i.e. ionization suppression), with CVs between 2.3 and 6.6% (Table S 3.).

#### 3.1.5. Stability

The stability of VX-970 stock solution at room temperature for 6 h was 96.7% (Table 1). Stability in stock solution for 8 months at  $-80^{\circ}\text{C}$  was 95.7%. The stability of the analyte after 3 freeze thaw cycles ( $-80^{\circ}\text{C}$  to RT) ranged between 98.1 and 99.6%. Long-term stability (8 months) of the analyte in plasma at  $-80^{\circ}\text{C}$  was adequate with recovery between 92.2 and 100.1%. The absolute responses of plasma extracts of VX-970 at the QC concentrations, when processed and kept in the autosampler for 72 h, were 102.7–114.4% of the initial responses (CV 2.6–3.9%), while the response of VX-970 relative to the internal standard signal ranged from 97.0 to 99.3% (CV 1.8–4.2%). Importantly, the reinjection run met the criteria set by the FDA [7].

#### 3.1.6. Dilution integrity

The samples diluted from 50,000 ng/mL to 2500 ng/mL (diluted 20 times) displayed an accuracy of 91.3% with a CV of 4.0%, indicating the dilution integrity of VX-970 in plasma.

#### 3.1.7. Anti-coagulant cross validation

Accuracy and precision of back-calculated concentrations were within 15% at QCL, QCM, and QCH concentrations (Table S 4).

## 3.2. Development

### 3.2.1. Mass spectrometry

The mass spectrometric parameters were optimized in order to obtain the largest parent ion and subsequent product ion from fragmentation for both VX-970 and IS. Both compounds were infused separately into the mass spectrometer with mobile phase containing either 50% methanol and 50% water with 0.1% formic acid or 50% acetonitrile and 50% water with 0.1% formic acid. There was no remarkable difference in the ionization effects between the chosen organic solvents. Acetonitrile was chosen as the organic solvent due to its greater ability to precipitate proteins and create a cleaner final matrix for our desired dilute and shoot sample preparation. Optimized mass spectrometric parameters are listed in Section 2.3.

### 3.2.2. Chromatography

We evaluated the following three columns: Synergi Polar RP 80 Å (50  $\times$  2.0 mm, 4  $\mu$ m), Synergi Hydro RP 80 Å (50  $\times$  2.0 mm,

**Table 1**  
Stability of VX-970 under varying conditions.

Storage condition	Concentration (ng/mL)	Stability (%)	CV (%)	Replicates
VX-970				
Stock solution 6 h				
Ambient temp	100,000	96.7	10.6	3
Stock solution 8 months				
–80 °C	100,000	95.7	4.0	3
Plasma 4 h				
Ambient temp.	QCL 5	96.2	6.2	3
	QCM 150	96.0	4.3	3
	QCH 4000	100.2	0.5	3
Plasma 3 freeze-thaw cycles				
–80 °C	QCL 5	98.1	3.9	4
	QCM 150	99.6	5.0	4
	QCH 4000	98.1	3.4	4
Plasma 8 months				
–80 °C	QCL 5	92.2	4.6	4
	QCM 150	100.1	3.8	4
	QCH 4000	96.2	4.0	4

4  $\mu\text{m}$ ), and Luna phenylhexyl (50  $\times$  2.0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ). VX-970 exhibited significant peak-tailing on the Luna column, which was therefore eliminated from the selection. The Polar RP and Hydro RP columns each produced acceptable VX-970 peak shapes but analysis of rat bile containing the glucuronide metabolite demonstrated that the Polar RP column provided better separation of parent and metabolite and was therefore selected for the method.

It was observed that greater than 75% acetonitrile in the mobile phase caused rapid elution of VX-970. We found that a gradient style elution gave adequate time to separate endogenous matrix components from VX-970 and still achieve a short run time. The final mobile phase composition elutes VX-970 during the terminal phase of the 0–2.2 min step where mobile phase A is increased from 30 to 80%.

Despite the short elution time, phospholipids from the human plasma matrix did not co-elute with VX-970 indicating that a potential signal interference was minimal.

The approximate retention time of both VX-970 and [d<sub>7</sub>]-VX-970 was 1.9 min. VX-970 had a capacity factor of 4.6 based on the observed void time of 0.34 min. Representative chromatograms of VX-970 (at the LLOQ), and internal standard in plasma are displayed in Fig. S. 2.

Carry-over was assessed by injecting 50,000 ng/mL of VX-970 and 5000 ng/mL of IS, followed by injection of 4 control plasma samples. Carry-over amounted to less than 0.02% for VX-970 and 0.2% for IS.

### 3.2.3. Extraction and sample preparation

To expedite sample preparation, we chose to pursue a method of dilute-and-shoot sample preparation. This process used a 1:4 ratio of sample to acetonitrile (v/v) and demonstrated the ability to obtain our desired sensitivity of the 3 ng/mL LLOQ. Despite achieving our desired sensitivity, the final sample extract produced peak fronting and general irregular chromatography, which was most likely due to the incompatibility of the organic to aqueous ratio between sample extract (80% organic) and initial mobile phase composition (30% organic). Resolving this discrepancy without alteration of our developed chromatographic method would require a decrease in the sample extract organic-to-aqueous ratio. Decreasing the amount of acetonitrile for extraction could compromise protein precipitation so we added an additional step of adding 150  $\mu\text{L}$  of water to 100  $\mu\text{L}$  supernatant of processed samples. This decreased the final organic composition of the sample to approximately 32% and thus closely replicated the initial mobile phase composition of 30% acetonitrile. Initial experimentation with this

processing method revealed a crucial step of thoroughly vortexing autosampler vials after capping. This minor addition to sample preparation restored peak shape, maintained LLOQ sensitivity and did not compromise efficiency of protein precipitation.

### 3.2.4. Glucuronide metabolite

Analysis of bile from rats treated with VX-970 revealed it contained both unconjugated VX-970 (retention 1.9 min) and the direct glucuronide of VX-970 metabolite (retention 0.83 min, see Fig. S. 2C). In-source fragmentation of the metabolite back to the VX-970 parent  $m/z$  was also observed. The latter observation is not considered a potential bias for the quantitation of VX-970 as the analytes were appropriately separated. We incorporated the corresponding MRM transition ( $m/z$  639.3 > 433.5) into the quantitation method to ensure that any metabolite in patient samples would be detected.

Incubation of bile at the tested pH values demonstrated no increase in VX-970 concentrations, indicating stability of the glucuronide metabolite as both a function of pH (5–9) and time (up to 4 h) (Table S 5). Bile spiked plasma incubated at room temperature for 4 h showed VX-970 concentrations were 96.5% stable (CV 4.7%), indicating that the glucuronide metabolite did not hydrolyse to produce parent VX-970.

VX-970 incubations in permeabilized human microsomes revealed no glucuronidation with 99.9% (CV 4.7%) of drug remaining in the incubation mixture after 60 min compared to 87.5% (CV 1.8%) in rat microsomes. No metabolite was observed in the 639.3 > 433.5  $m/z$  glucuronide channel in rat the microsome incubation, most likely due to being below the limit of sensitivity. These experiments lend further evidence that the glucuronidation pathway for VX-970 is species specific and does not occur in humans. Positive control experiments confirmed glucuronidation of SN-38 in both rat and human microsomes both measured as SN-38 depletion and SN-38 glucuronide generation. These experiments demonstrate that the UGT isoforms responsible for VX-970 glucuronidation in rats are either not present in humans or have a very low activity.

### 3.3. Application of assay

All patient plasma samples analyzed had VX-970 concentrations within the calibration range. Visual inspection of the time-concentration plot revealed a distinct biphasic elimination profile as seen in Fig. 2. A  $C_{\text{max}}$  of 343 ng/mL was observed near the end of the 1 h infusion. Non-compartmental analysis of this data resulted in the following PK parameter values:  $T_{1/2}$  of 14 h,  $AUC_{0-72}$  2.43  $\mu\text{g H/mL}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  2.50  $\mu\text{g H/mL}$ ,  $V_{\text{ss}}$  386 L/ $m^2$ , and CI



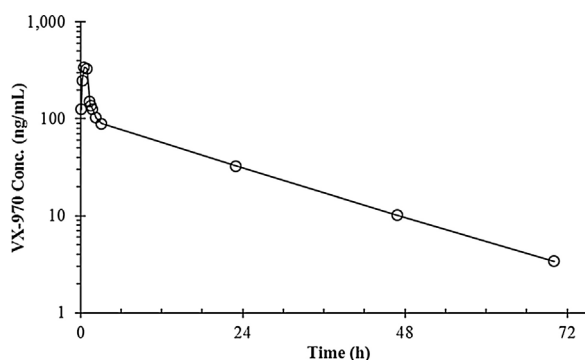


Fig. 2. VX-970 (○) plasma concentrations in a patient administered a 1 h intravenous infusion of 60 mg/m<sup>2</sup> VX-970.

24.0 L/h/m<sup>2</sup>. Additionally, monitoring the glucuronide metabolite MRM channel revealed no glucuronide metabolite in any sample analyzed.

#### 4. Conclusion

With the clinical development of ATR inhibitors such as VX-970, a thorough description of their clinical pharmacokinetics is needed. To support these investigations, our aim in the present study was to develop and validate an analytical method for VX-970 in human plasma that ensures accurate and reliable quantification. This method will be used to quantitate VX-970 in plasma samples being obtained from ongoing and future clinical trials.

VX-970 was detected by a triple quadrupole mass spectrometer in MRM mode after separation from matrix components by reverse-phase chromatography. We developed a facile “dilute and shoot” method of sample preparation that included an additional post-protein precipitation dilution step with water that resolved an observed aqueous-to-organic ratio incompatibility between initial mobile phase conditions and final sample extract.

Previous investigations have indicated that rodents produce a direct glucuronide metabolite but evidence of this biotransformation in humans has yet to be demonstrated. Incubations of VX-970 permeabilized human microsomes revealed no occurrence of metabolism. To guard against potential interference from this metabolite, we made efforts to ensure instability and in-source fragmentation would not affect our assay by analyzing bile samples from rats treated with VX-970. From our investigations of metabolite conversion back to VX-970, we determined that the metabolite is stable under our assay conditions and its presence does not affect VX-970 response. Complete chromatographic separation of the analytes nullifies potential effects from in-source fragmentation of metabolite into the VX-970 channel. Additionally, no metabolite was detected in the analysis of the patient accrued onto a VX-970 phase I trial, which further suggests any glucuronide metabolite will not interfere with VX-970 quantification.

This is the first quantitative assay for VX-970 to be published. Our assay range captured the entire time-concentration curve of the analyzed patient treated with VX-970, including a 72 h sample which was still above the LLOQ. While the observed C<sub>max</sub> was vastly below our ULQ, this assay will accommodate increasing VX-970 concentrations as dose is escalated.

In conclusion, we have successfully developed a rapid and facile LC-MS/MS assay for VX-970 quantification in human plasma, which is expected to cover the entire clinical concentration range. This assay will prove to be a valuable tool in supporting the clinical development of VX-970.

#### Acknowledgements

Support: Grant UM1-CA186690 (NCI-CTEP), RO1 CA204173, and R50 CA211241. This project used the UPCI Cancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Facility (CPPF) and was supported in part by award P30-CA47904. Andre Iffland is an employee of and holds stock in Vertex Pharmaceuticals.

We thank Martin Howard (Vertex) for help in obtaining VX-970 treated rat bile sample.

#### Appendix A. Supplementary data

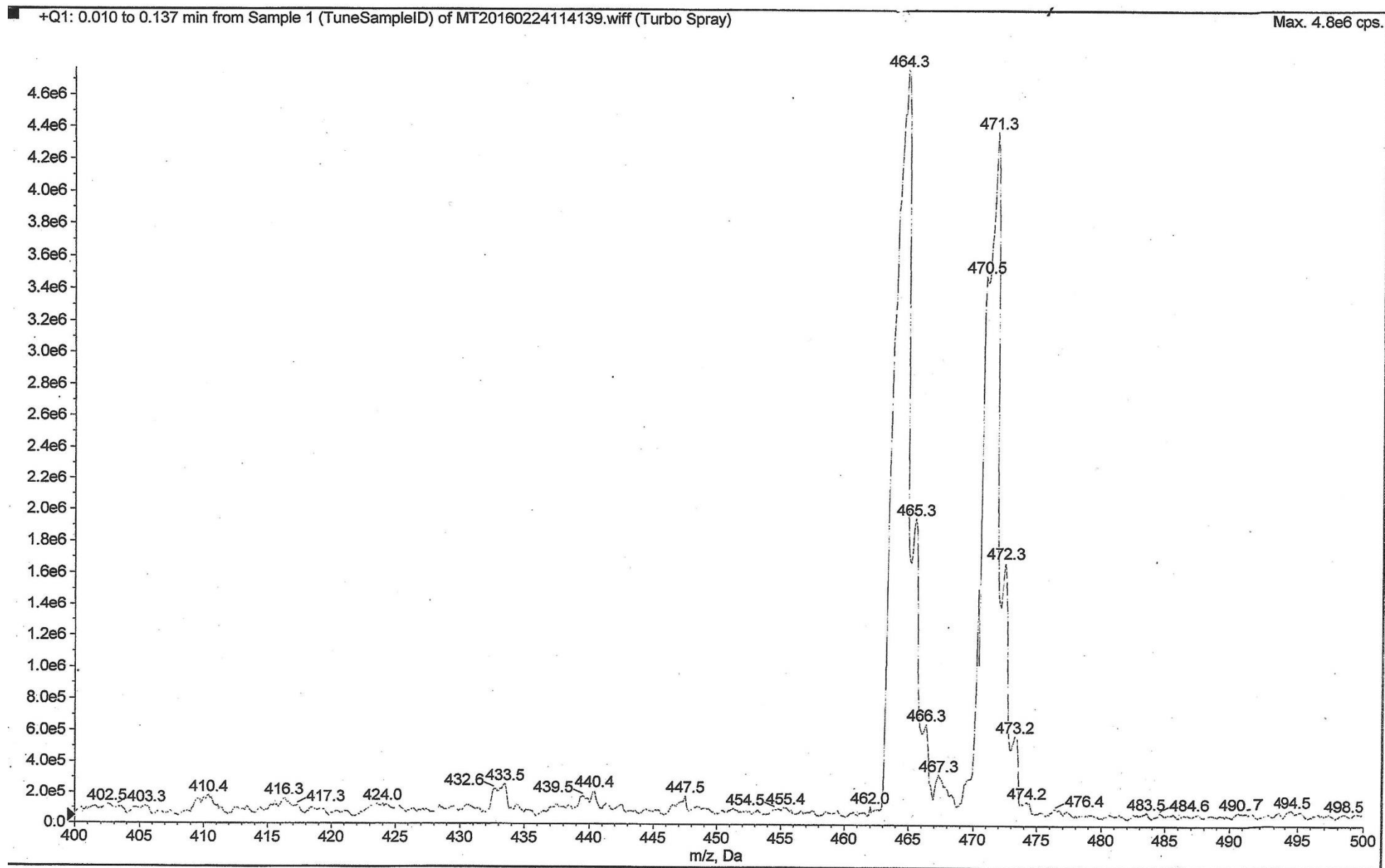
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.037>.

#### References

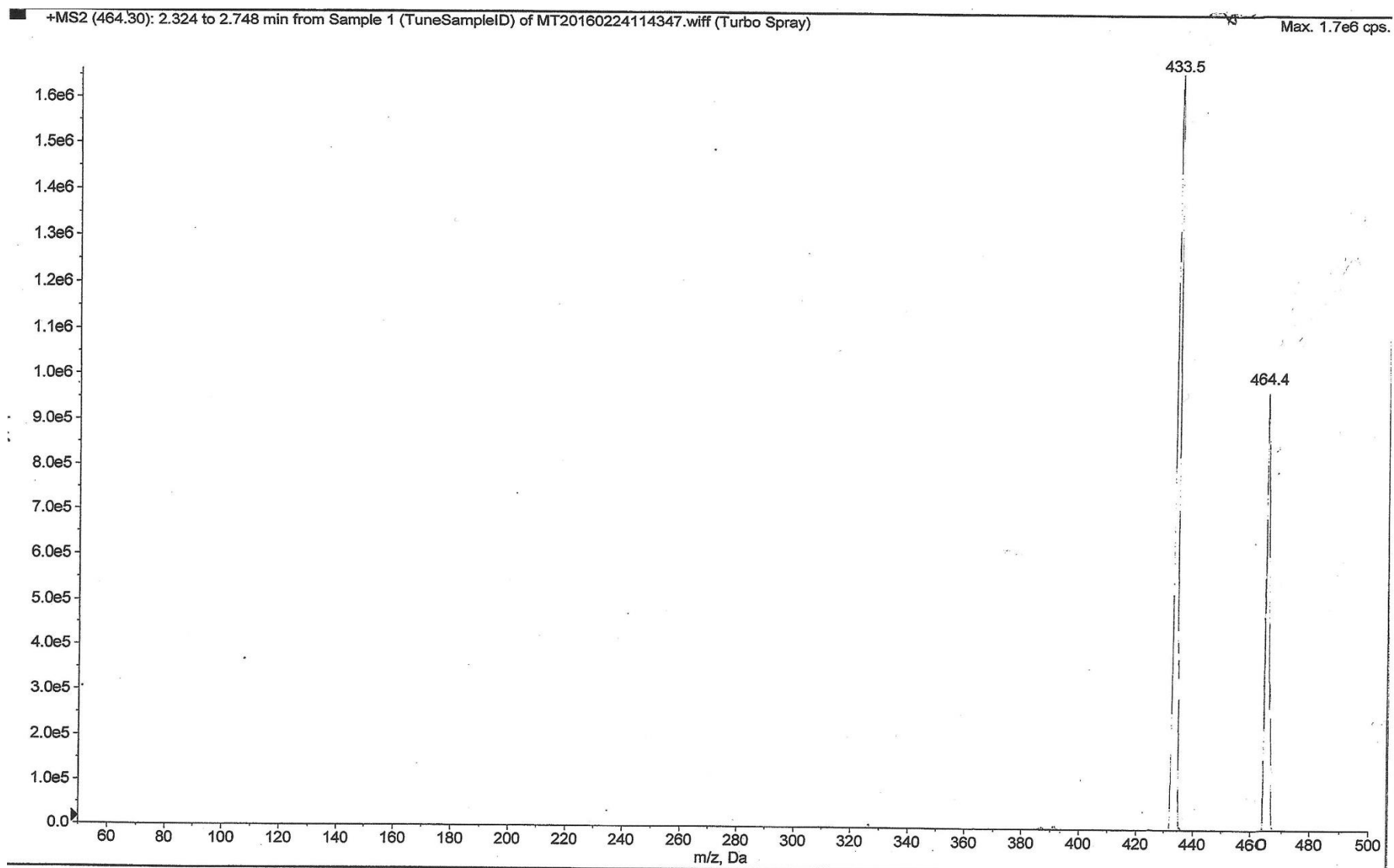
- [1] A. Ciccia, S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives, *Mol. Cell* 40 (2) (2010) 179–204.
- [2] J. Bartkova, Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, J. Bartek, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis, *Nature* 434 (7035) (2005) 864–870.
- [3] K. Savitsky, A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D.A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S.R. Patanjali, A. Simmons, G.A. Clines, A. Sartiel, R.A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M.F. Lavin, N.G. Jaspers, A.M. Taylor, C.F. Arlett, T. Miki, S.M. Weissman, M. Lovett, F.S. Collins, Y. Shiloh, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science* 268 (5218) (1995) 1749–1753.
- [4] K.A. Cimprich, T.B. Shin, C.T. Keith, S.L. Schreiber, cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (7) (1996) 2850–2855.
- [5] S. Choi, C.J. Bakkenist, Brd4 shields chromatin from ATM kinase signaling storms, *Sci. Signal.* 6 (293) (2013) 30.
- [6] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control, *Nat. Med.* 10 (8) (2004) 789–799.
- [7] P.M. Reaper, M.R. Griffiths, J.M. Long, J.D. Charrier, S. McCormick, P.A. Charlton, J.M. Golec, J.R. Pollard, Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR, *Nat. Chem. Biol.* 7 (7) (2011) 428–430.
- [8] H. Jiang, H.C. Reinhardt, J. Bartkova, J. Tommiska, C. Blomqvist, H. Nevanlinna, J. Bartek, M.B. Yaffe, M.T. Hemann, The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response, *Genes. Dev.* 23 (16) (2009) 1895–1909.
- [9] F.P. Vendetti, A. Lau, S. Schamus, T.P. Conrads, M.J. O'Connor, C.J. Bakkenist, The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo, *Oncotarget* 6 (42) (2015) 44289–44305.
- [10] K.M. Foote, A. Lau, J.W. Nissink, Drugging ATR: progress in the development of specific inhibitors for the treatment of cancer, *Fut. Med. Chem.* 7 (7) (2015) 873–891.
- [11] E. Fokas, R. Prevo, J.R. Pollard, P.M. Reaper, P.A. Charlton, B. Cornelissen, K.A. Vallis, E.M. Hammond, M.M. Olcina, W. Gillies McKenna, R.J. Muschel, T.B. Brunner, Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation, *Cell. Death. Dis.* 3 (2012) e441.
- [12] R. Prevo, E. Fokas, P.M. Reaper, P.A. Charlton, J.R. Pollard, W.G. McKenna, R.J. Muschel, T.B. Brunner, The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy, *Cancer. Biol. Ther.* 13 (11) (2012) 1072–1081.
- [13] A.B. Hall, D. Newsome, Y. Wang, D.M. Boucher, B. Eustace, Y. Gu, B. Hare, M.A. Johnson, S. Milton, C.E. Murphy, D. Takemoto, C. Tolman, M. Wood, P. Charlton, J.D. Charrier, B. Furey, J. Golec, P.M. Reaper, J.R. Pollard, Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970, *Oncotarget* 5 (14) (2014) 5674–5685.
- [14] K.P. Kim, R.A. Parise, J.L. Holleran, L.D. Lewis, L. Appleman, N. van Erp, M.J. Morris, J.H. Beumer, Simultaneous quantitation of abiraterone, enzalutamide, N-desmethyl enzalutamide, and bicalutamide in human plasma by LC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 197–205.
- [15] J.L. Little, M.F. Wempe, C.M. Buchanan, Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: examining lipid matrix ionization effects in plasma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 833 (2) (2006) 219–230.
- [16] G. Zhang, C.E. Wujcik, Overcoming ionization effects through chromatography: a case study for the ESI-LC-MS/MS quantitation of a hydrophobic therapeutic agent in human serum using a stable-label internal standard, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (22) (2009) 2003–2010.
- [17] K.A. Seo, H.J. Kim, E.S. Jeong, N. Abdalla, C.S. Choi, D.H. Kim, J.G. Shin, In vitro assay of six UDP-glucuronosyltransferase isoforms in human liver microsomes, using cocktails of probe substrates and liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Metab. Dispos.* 42 (11) (2014) 1803–1810.
- [18] G. Corona, C. Elia, B. Casetta, G. Toffoli, Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine assessment of irinotecan metabolic phenotype, *Ther. Drug Monit.* 32 (5) (2010) 638–646.
- [19] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation; and Research Center for Veterinary Medicine, 2001.
- [20] H. Rosing, W.Y. Man, E. Doyle, A. Bult, J.H. Beijnen, Bioanalytical liquid chromatographic method validation. a review of current practices and procedures, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (3) (2000) 329–354.

# ANNEXE III : SPECTRE DE MASSE DU VX-970 ET DE SON ÉTALON INTERNE [d7]-VX-970



# SPECTRE DE MASSE DU VX-970 : ION PARENT>ION ENFANT





# SPECTRE DE MASSE DE L'ÉTALON INTERNE [d7]-VX-970 : ION PARENT>ION ENFANT

