



INTERACTIONS ENTRE THERAPIES CIBLEES ANTI-ANGIOGÉNIQUES (BEVACIZUMAB, SORAFÉNIB) ET TRANSPORTEURS D'EFFLUX

Mahamadou Tandia

► To cite this version:

Mahamadou Tandia. INTERACTIONS ENTRE THERAPIES CIBLEES ANTI-ANGIOGÉNIQUES (BEVACIZUMAB, SORAFÉNIB) ET TRANSPORTEURS D'EFFLUX. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS424 . tel-01827017

HAL Id: tel-01827017

<https://theses.hal.science/tel-01827017>

Submitted on 1 Jul 2018

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

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

NNT : 2017SACLS424

INTERACTIONS ENTRE THERAPIES CIBLEES ANTI-ANGIOGÉNIQUES (BEVACIZUMAB, SORAFÉNIB) ET TRANSPORTEURS D'EFFLUX

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'université Paris Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : sciences pharmacologiques

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 05 décembre 2017, par

Mr Mahamadou TANDIA

Composition du Jury :

Pr. Christine FERNANDEZ

Président du jury

Professeur des universités (Paris Sud) – Praticien des hôpitaux
Chef du service de pharmacie de l'hôpital Saint Antoine (AP-HP)

Pr. Bertrand DIQUET

Rapporteur

Professeur des universités (Angers) – Praticien des hôpitaux
Chef du service du laboratoire de pharmacologie- toxicologie-CHU d'Angers

Pr. Olivier BOURDON

Rapporteur

Professeur des universités (Paris V) – Praticien des hôpitaux
Chef du service de pharmacie de l'hôpital Robert Debré (AP-HP)

Dr. Laurence BONHOMME – FAIVRE

Directrice de thèse

Maître de conférences des universités (Paris Sud) – Praticien des hôpitaux
Chef du service de pharmacie de l'hôpital Paul Brousse (AP-HP)

Remerciements

A Madame le Docteur Laurence BONHOMME- FAIVRE

Pour m'avoir confié ce travail et l'avoir dirigé.

Veillez recevoir ici toute ma profonde gratitude pour votre aide, votre attention et votre disponibilité tout au long de ce travail, malgré vos nombreuses occupations.

A Madame le Professeur Christine FERNANDEZ

Qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, merci pour votre disponibilité.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bertrand DIQUET

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Olivier BOURDON

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Je remercie toute l'équipe de l'ex-unité de recherche UPRES EA 4123 de l'université Paris-Sud XI, Particulièrement le Docteur Marie-Sophie Hudson et le Professeur Robert FARINOTTI.

Merci à toute l'équipe du département d'expérimentation animale de l'Institut Gustave Roussy, à Mélanie Polrot, Patrick Gonin.

Mes remerciements à Monsieur le Docteur Bernard PAULE à toute l'équipe de consultation du centre hépatobiliaire de l'hôpital Paul Brousse.

Je remercie Madame le Professeur Annelise BENNACEUR-GRISCELI et l'équipe de l'unité Inserm 935 « Modèles de cellules souches malignes et thérapeutiques » pour avoir accepté mon rattachement à son unité de recherche.

Merci à Raphaël Saffroy de l'équipe de biologie moléculaire de l'hôpital Paul Brousse.

Mes vifs remerciements à toute l'équipe de pharmaciens et de préparateurs de la pharmacie à usage intérieur de l'hôpital Brousse, Eric Rudant, Madji Fodil, Chritophe Rouchon, vincent Castagne, Celine Chu, Vanessa Thibault, Nhu Lan Bui, Béatrice Fournier...

Une pensée spéciale à Madame le Docteur Simone Orbach, pour ses encouragements et ses aides pendant la rédaction de cette thèse.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman, ma femme, mes enfants, mon frère Boubacar TANDIA...

Une pensée pour terminer ces remerciements pour toi mon Papa qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais je sais que tu aurais été très fier de ton fils ! ! !

Mes remerciements à tous ceux que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront.

Résumé :

Le traitement des cancers constitue un problème de santé publique et repose entre autres sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, le blocage de l'angiogenèse fait l'objet de nombreux essais cliniques.

L'intervention de transporteurs membranaires d'efflux, comme la P-glycoprotéine (P-gp) joue un rôle important sur le plan pharmacocinétique, pharmacogénétique et dans la résistance aux médicaments anticancéreux.

Nous avons observé chez des patients atteints de CHC une grande variabilité des paramètres pharmacocinétiques du sorafénib (inhibiteur de tyrosine kinase, anti-angiogénique et substrat de la P-gp et de la BCRP) et une tendance à une meilleure réponse clinique dans le groupe hétérozygote, ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT et ABCG2 421CA par rapport aux groupes homozygotes (type sauvage et mutant) avec une association significative aux concentrations plasmatiques normalisées aux poids.

Nos travaux ont montré *in vitro* qu'un prétraitement avec des médicaments anti-angiogéniques tels que le bévécizumab et le sorafénib entraînait une réversion de la résistance à la doxorubicine (substrat de la P-gp) dans un modèle de cellules IGR OV1-DXR (résistantes à la doxorubicine et surexprimant la P-gp) par modulation de la fonctionnalité de la P-glycoprotéine. Cette réversion a été objectivée par l'augmentation significative des concentrations intracellulaires de la doxorubicine dans les cellules IGR OV1-DXR.

Nous avons montré pour la première fois que le bévécizumab, anticorps anti VEGF inhibe la fonctionnalité de la P-gp. Ce médicament est couramment prescrit avec l'irinotécan dans le cadre du traitement du cancer colorectal métastasé.

In vivo chez la souris xénogreffée de cancer colorectal humain, un prétraitement par le bévécizumab a entraîné une augmentation significative des concentrations plasmatiques du SN38 (métabolite actif de l'irinotécan et substrat de la P-gp), de même que de l'AUC et de la Cmax plasmatique de l'irinotécan (substrat de la P-gp) après administration orale de l'irinotécan. Une augmentation significative de l'AUC plasmatique du sorafénib après un prétraitement par le bévécizumab a été également observée sur le même modèle expérimental.

La modulation d'activité des transporteurs d'efflux par les thérapies ciblées anti-angiogéniques pourrait entraîner une augmentation de la réponse clinique avec une réversion de la résistance des cellules tumorales et endothéliales surexprimant des transporteurs d'efflux et en particulier la P-gp.

Mots clés : ABCB1 pharmacocinétique, pharmacogénétique, bévécizumab, sorafénib, irinotécan

Abstract:

Treatment of cancers is a public health problem and based on surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy and targeted therapies. Among the new therapeutic strategies, blocking of angiogenesis was the subject of several clinical trials.

Intervention of membrane efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) plays an important pharmacokinetic and pharmacogenetic role in anticancer drugs resistance.

We observed in patients with HCC, a great pharmacokinetics parameters variability of sorafenib (tyrosine kinase inhibitor, anti-angiogenic drug and P-gp and BCRP substrate) and a tendency to a better clinical response in the ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT and ABCG2 421CA heterozygous group than in the homozygous group (wild type and mutant).

Our work showed *in vitro* that pretreatment with anti-angiogenic drugs such as bevacizumab and sorafenib resulted in a resistance reversion to doxorubicin (P-gp substrate) in an IGROV1 – DXR cells (resistant to doxorubicin and P-gp overexpressing cells) by modulating the functionality of P-glycoprotein. This reversion is measured by the significant increase in intracellular doxorubicin concentrations in IGR OV1-DXR cells.

We showed for the first time that bevacizumab, an anti VEGF antibody, inhibits the functionality of P-gp. This drug is commonly prescribed with irinotecan for the treatment of metastatic colorectal cancer.

In vivo in human colorectal cancer xenograft mice, bevacizumab pretreatment led to a significant increase in plasma concentrations of SN38 (active metabolite of irinotecan and P-gp substrate), as well as plasma AUC and Cmax of irinotecan (P-gp substrate) after oral administration of irinotecan. Similarly, a significant increase in plasma AUC of sorafenib after bevacizumab pretreatment was observed on the same experimental model.

The modulation of efflux transporter activity by targeted anti-angiogenic therapies could lead to an increase in the clinical response with a reversion of the resistance of tumor and endothelial cells overexpressing efflux transporters, particularly P-gp.

Keywords: ABCB1, pharmacokinetics, pharmacogenetics, bevacizumab, sorafenib, irinotecan

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	13
INTRODUCTION	15
PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE	21
CHAPITRE I : ANGIOGENESE ET THERAPIES CIBLEES ANTI-ANGIOGENIQUES.....	22
1. <i>Angiogenèse</i> :	22
1.1. Concept du switch angiogénique :	25
1.2 VEGF et système immunitaire :	27
1.3. Principe du ciblage anti-angiogénique : [28].....	30
1.4. Avantages théoriques et limites pratiques de la stratégie anti-angiogénique :	31
2. <i>Les thérapies ciblées anti angiogéniques</i> :	31
2.1. Les différentes stratégies d'inhibition de la prolifération tumorale.....	34
2.2. Mécanismes d'action des thérapies ciblées anti-angiogéniques :	36
2.3. Toxicité des thérapies ciblées anti-angiogéniques :	39
2.4. Exemples de thérapies ciblées anti-angiogénique :	41
2.5. Résistance aux thérapies ciblées anti-angiogéniques :	43
CHAPITRE II : TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES ET POLYMORPHISMES GENETIQUES	47
1. <i>Transporteurs membranaires</i> :	47
2. <i>Transporteurs exprimés au niveau hépatique</i> :	50
2.1. Transporteurs d'influx :	50
2.2. Transporteurs d'efflux :	52
3. <i>Pharmacogénétique et variations du métabolisme et du transport des médicaments</i> :	54
3.1. La P-Glycoprotéine (P-gp), une pompe d'efflux :	57
3.2. La Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) :	58
3.3. Polymorphisme génétique :	58
CHAPITRE III : PATHOLOGIES CANCEREUSES ET MEDICAMENTS ETUDIES DANS NOS TRAVAUX PERSONNELS	60
1. <i>Carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie)</i> :	60
1.1. Epidémiologie.....	60
1.2. Physiopathologie	61
1.3. Éléments nécessaires à la stratégie thérapeutique.....	62
1.4. Traitements :	66
1.4.1. <i>Transplantation hépatique</i> :	67
1.4.2. <i>Résection chirurgicale</i> :	67
1.4.3. <i>Méthodes ablatives transcutanées</i> :	68
1.4.4. <i>Approches endoartérielles</i>	68
1.4.5. <i>chimio-embolisation</i>	68
1.4.6. <i>Radio-embolisation</i>	68
1.4.7. <i>Radiothérapie externe</i>	69
1.4.8. <i>Sorafénib (Nexavar ®)</i>	69

1.4.9. Régorafénib (STIVARGA®)	70
2. Médicaments du traitement du CHC utilisés dans nos travaux :	71
2.1. Sorafénib (NEXAVAR ®): [60]	71
2.1.1. Indications	71
2.1.2. Pharmacocinétique :	71
2.1.3. Interactions :	73
2.2. Doxorubicine : [60]	74
2.2.1. Indications :	74
2.2.2. Pharmacocinétique :	75
2.2.3. Interactions :	75
3. Cancer colorectal :	77
3.1. Epidémiologie :	77
3.2. Physiopathologie :	77
3.3. Traitements :	78
3.3.1. Chirurgie :	78
3.3.3. Chimiothérapie palliative :	79
3.4. Cancer colorectal métastatique :	81
3.4.1. Traitement :	81
3.4.1.1. Recommandations :	82
3.4.1.2. Choix de la chimiothérapie :	82
3.4.1.3. Utilisation de biothérapies :	83
4. Médicaments du traitement du CCR utilisés dans nos travaux :	85
4.1. Bévacicumab (AVASTIN ®): [60]	85
4.1.1. Indication :	85
4.1.2. Pharmacocinétique :	85
4.1.3. Interactions :	86
4.2. Irinotécan (CAMPOT®) : [60]	87
4.2.1. Indications :	88
4.2.2. Pharmacocinétique :	88
4.2.3. Interactions :	90
PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS	91
ARTICLE 1: CORRELATION BETWEEN CLINICAL RESPONSE TO SORAFENIB IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA TREATMENT AND POLYMORPHISMS OF PGLYCOPROTEIN (ABCB1) AND OF BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (ABCG2): MONOCENTRIC STUDY. PUBLIE DANS CANCER CHEMOTHERAPY PHARMACOLOGY. 2017 APR;79(4):759-766.....	92
ARTICLE 2: BEVACIZUMAB MODULATES P-GLYCOPROTEIN FUNCTION <i>IN VITRO</i> AND INCREASES CONCENTRATIONS OF IRINOTECAN AND OF ITS ACTIVE METABOLITE SN-38 IN PLASMA OF HUMAN COLORECTAL CARCINOMA-BEARING MICE. ACCEPTÉ POUR PUBLICATION DANS RESEARCH & REVIEWS IN PHARMACY & PHARMACEUTICAL SCIENCES JOURNAL RRJPPS VOLUME 6 ISSUE 4 SEPTEMBER, 2017 E-ISSN:2320-1215 P-ISSN:2322-0112	110
ARTICLE 3: BEVACIZUMAB AND SORAFENIB MODULATE P-GLYCOPROTEIN FUNCTION <i>IN VITRO</i> AND BEVACIZUMAB INCREASES <i>IN VIVO</i> SORAFENIB CONCENTRATIONS IN PLASMA OF HUMAN COLORECTAL CARCINOMA-BEARING MICE. SOUMIS À PUBLICATION (2017).....	142
CONCLUSION GENERALE.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	194

LISTE DES ABBREVIATIONS

5FU : 5 Fluorouracile

5-FU/LV : 5 Fluorouracile/Lecovorin

ABC : adénosine triphosphate Binding Cassette

ADN : acide désoxyribonucléique

AF : acide folinique

AFP : alfa foetoprotéine

AKT : protéine kinase B

ALAT : alanine aminotransférases

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASAT : aspartate aminotransférase

ATP : adénosine triphosphate Binding Cassette

AUC : Aire sous la courbe

AVK : antivitamine K

BCLC : Barcelona Clinic Liver Cancer

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BCRP : Breast cancer resistance protein

CCR : Cancer Colorectal

CCRM : cancer colorectal métastatique

CHC : Cancer Hépatocellulaire

CLIP, GRETCH, TNM-AJCC

Cmax : Concentration maximale

CYP : Cytochrome

CYP450 : cytochrome P450

DXR : Doxorubicine Résistante

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

EMT : épithéliale-mésenchymateuse

Ex : Exemple

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche

FFCD : Fédération Francophone de Cancérologie Digestive

FGF2 : fibroblaste growth factor-2

FLT-3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FOLFIRI : irinotécan/5-fluorouracile/acide folinique

HIF : hypoxic inductible factor

HIF : hypoxia-inducible transcription factor

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

HTA : hypertension artérielle

IFL : Irinotécan/fluorouracil/leucovorin

IgG : immunoglobuline G

IGROV1 : cancer ovarien humain

IGROV1-DXR : cancer ovarien humain-cellules résistantes à la doxorubicine

IGROV1-p : cancer ovarien humain-cellules parentales

IL-6 : interleukine-6

INCa : Institut National du Cancer

INR : International Normalized Ratio

InVS : Institut de veille sanitaire

IV : Intraveineuse

KDR : Kinase insert domain receptor

l/jour : litre/jour

l/h/m² : Litre/heure/ mètre carré

l/m² : Litre/mètre carré

LSN : limite supérieure normale

LT8 : lymphocytes T CD8

MATE : Multidrug And Toxin Extrusion

MDR : Multidrug Resistance

MELD : Model for End-Stage Liver Disease

mg/ m² : Milligramme /mètre carré

mg/kg : Milligramme/kilogramme

MMP : matrix métallo protéinase

MRP : Multidrug resistance-associated protein

MRT : Mean Residence Time

NOS : nitric oxide synthase

OAT : Transporteurs d'anions organiques

OATP : Transporteurs Polypeptidiques d'Anions Organiques

OCT : Transporteurs de cations organiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : survie globale

PDGFR- β : platelet derived growth factor receptor beta

P-gp : P- glycoprotéine

PK : pharmacocinétique

PIGF : placenta growth factor

PTX : paclitaxel

RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire

RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RSD : écart-type relatif

SCF : stem cell factor

SDF-1 : stromal derived factor-1

SLC : solute carrier transporters

SN38 : métabolite actif de l'irinotécan

SNP : single nucleotide polymorphism

STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*

TEC : cellules endothéliales tumorales

TH : transplantation hépatique

Tmax : Temps pour atteindre la concentration maximale

TNM : Tumeur primitive Nodules Métastases

UGT : uridine diphosphate glucuronyl transférase

UICC : Union for International Cancer Control

VEGF : Vascular endotelial growth factor

VEGF TRAP : Aflibercept (ZALTRAP®)

VEGFR : Vascular endotelial growth factor receptor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents modes de formation des vaisseaux tumoraux

Figure 2 : récepteurs et voies de transduction des signaux de prolifération

Figure 3 : La ligue contre le cancer. Thérapie ciblée : une révolution médicale

Figure 4 Schéma de la voie de transduction impliquant EGFR et les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la progression tumorale

Figure 5. Les mécanismes de résistance de la cellule endothéliale aux agents anti-angiogéniques.

Figure 6 : Absorption et relargage au niveau de la membrane cellulaire

Figure 7 : Les 4 types de transports membranaires

Figure 8 : *Localisation des transporteurs SLC dans une cellule polarisée*

Figure 9 : *Localisation des transporteurs ABC dans une cellule polarisée*

Figure 10 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques

Figure 11 : La classification de CHC selon BCLC

Figure 12 : les différents traitements du cancer colorectal

Figure 13. Stratégie thérapeutique médicale dans le traitement des cancers
colorectaux métastatiques

INTRODUCTION

La prise en charge des cancers pose des enjeux, à la fois humains et sociétaux importants, et constitue un réel problème de santé publique. En France Métropolitaine 385 000 nouveaux cas de cancer et 149500 décès par cancer ont été estimés en 2015 [1].

Le traitement des cancers s'appuie depuis plus de quarante ans sur quatre stratégies: la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie [2]. Les progrès médicaux de ces dernières années ont permis l'amélioration de la survie sans progression des patients atteints de cancer, et même leur survie globale. Ceci résulte de la mise à disposition de plusieurs protocoles de traitement, possédant chacun, leurs avantages et leurs limites.

La chirurgie et la radiothérapie conduisent à la réduction voire à l'élimination de la masse tumorale dans la mesure où celle-ci est accessible et localisée. Ces techniques n'arrivent cependant pas à atteindre les cellules cancéreuses si elles sont dispersées, et métastasées.

La chimiothérapie vise à détruire les cellules tumorales là où elles sont, sans cependant pouvoir épargner totalement les cellules saines. Toutefois, le traitement des formes métastatiques constitue aujourd'hui un réel enjeu thérapeutique.

La recherche fondamentale a ainsi permis progressivement de trouver des médicaments anticancéreux, puis d'en définir expérimentalement les modalités d'utilisation (efficacité, toxicité) et d'étudier leur mécanisme d'action. Ceci a abouti à la mise à disposition de médicaments, à efficacité prouvée sur les cellules tumorales et à toxicité moindre à l'égard des tissus sains avec un meilleur rapport bénéfice-risque.

Des études *in vitro* ont ainsi défini différentes voies de signalisation parmi lesquelles l'angiogenèse, processus physiologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux préexistants, pour permettre un apport en nutriment et surtout en oxygène aux organismes multicellulaires et d'assurer leur croissance et/ou leur survie [3].

L'angiogenèse est un processus indispensable à la croissance tumorale et au développement des métastases. Le blocage de ce processus par un certain nombre de thérapies ciblées est de nos jours largement utilisé dans les stratégies thérapeutiques, en particulier celui du VEGF (Vascular endothelial growth factor), molécule jouant un rôle central dans ce processus [2].

Cependant, il s'avère que la découverte de nouveaux médicaments plus efficaces et avec moins d'effets secondaires est devenue de plus en plus difficile et coûteuse. L'idée d'augmenter l'efficacité des traitements par l'association de médicaments déjà commercialisés est de plus en plus étudiée. En plus de rechercher de nouvelles substances et de définir le mécanisme par lequel celles-ci perturbent la croissance tumorale sans en même temps affecter les cellules saines de leur voisinage, un des concepts thérapeutiques cherche à augmenter l'efficacité thérapeutique des médicaments ayant déjà une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), en essayant de les maintenir à l'intérieur de la cellule tumorale, et de diminuer leur efflux hors de la cellule cancéreuse au moment du passage transmembranaire.

L'entrée et la sortie de ces médicaments dans les cellules impliquent l'intervention de transporteurs membranaires (influx et / ou efflux). Ces transporteurs interviennent

à toutes les étapes de la pharmacocinétique et toute variation de leur activité, d'origine génétique, environnementale ou interactionnelle, pourra potentiellement modifier le niveau d'exposition systémique ou tissulaire du médicament.

Les transporteurs membranaires sont présents dans toutes les cellules, ils sont particulièrement nombreux dans certaines cellules comme les entérocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales des tubes rénaux, les cellules des barrières hémato-méningée et hémato-testiculaire et du placenta.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux pathologies cancéreuses touchant l'appareil digestif, le Cancer Hépatocellulaire (CHC), et le Cancer Colorectal (CCR), qui sont traités par des médicaments ciblant l'angiogenèse, notamment le sorafénib et le bévacizumab, ainsi que l'interaction entre ces derniers et les transporteurs d'efflux tels que la P- glycoprotéine (P-gp) et la Breast cancer resistance protein (BCRP).

Le sorafénib (utilisé en monothérapie dans le CHC), est un agent anti-angiogénique, qui inhibe l'activité des cibles présentes dans les cellules tumorales (CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, et FLT-3) et la vascularisation tumorale (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR- β). Les RAF-kinases sont des sérine/thréonine-kinases, alors que les c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR- β sont des récepteurs à tyrosine-kinase. C'est le premier traitement systémique qui ait entraîné un allongement significatif de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients traités [4]. Il appartient à la famille des inhibiteurs de tyrosines kinases, qui sont des molécules de faible poids moléculaire, actives par voie orale, à métabolisme hépatique, ce qui ouvre la voie à des interactions médicamenteuses.

Le bévacizumab (anticorps monoclonal), est le chef de file des biothérapies interagissant avec l'angiogenèse par blocage du VEGF. Utilisé en première ligne associé à l'irinotécan dans le CCR métastatique, il peut améliorer l'efficacité des chimiothérapies existantes sans qu'on ait à augmenter leur dose, et par là même leur toxicité.

La présence en grande quantité des transporteurs d'efflux au niveau des entérocytes et des hépatocytes, est à l'origine de diverses interactions avec comme conséquence éventuellement des résistances aux traitements (multidrug resistance = MDR).

Ce travail en a pour objectif d'étudier l'impact pharmacocinétique et pharmacogénétique des transporteurs d'efflux sur l'utilisation de certains médicaments de chimiothérapie quand ils sont associés à certaines thérapies ciblées anti-angiogéniques.

Il se divise en deux grandes parties :

La première partie consiste en une revue de la littérature d'une part sur les thèmes de l'angiogenèse, des thérapies ciblées anti-angiogéniques, et des transporteurs membranaires (P-glycoprotéine, et Breast Cancer Resistance Protein) et d'autre part sur le CHC et le CCR, ainsi qu'une présentation des médicaments utilisés dans le traitement et dans nos études.

La deuxième partie est consacrée à nos travaux personnels qui s'articulent autour de trois articles :

- l'étude de corrélation entre la pharmacocinétique du sorafénib, la réponse clinique et le polymorphisme des transporteurs d'efflux, P-glycoprotéine (ABCB1) et Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) chez les patients traités pour un cancer hépatocellulaire (publiée dans *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2017 Apr;79(4):759-766).
- l'étude de l'effet du prétraitement avec le bévacicumab, *in vitro* sur les concentrations intracellulaires de la doxorubicine dans des cellules doxorubicine résistantes (DXR) et *in vivo* sur les concentrations plasmatiques et tumorales de l'irinotécan et de son métabolite actif (SN38) chez les souris nude xénogreffées d'un cancer colorectal humain. (accepté pour publication dans *Research & Reviews in Pharmacy & Pharmaceutical Sciences Journal*. September, 2017 e-ISSN:2320-1215p-ISSN:2322-0112).
- l'étude de l'effet du prétraitement avec le bévacicumab et le sorafénib, *in vitro* sur les concentrations intracellulaires de doxorubicine dans des cellules doxorubicine résistantes (DXR) et *in vivo* l'effet du prétraitement avec le bévacicumab sur les concentrations plasmatiques du sorafénib chez les souris nude xénogreffées d'un cancer colorectal humain (soumis à publication).

PARTIE I : REVUE DE LA **LITTERATURE**

Chapitre I : Angiogenèse et thérapies ciblées anti-angiogéniques

1. Angiogenèse :

L'angiogenèse est un processus régulé par une balance entre des molécules favorisant l'angiogenèse, appelées pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, FGF...) et des molécules la limitant, appelées anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine) [5].

L'angiogenèse est indispensable à la croissance physiologique et à l'opposé son absence est létale. L'angiogenèse s'applique donc à des phénomènes physiologiques (croissance embryonnaire, formation du placenta, cicatrisation...) ; à des phénomènes pathologiques (rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire, cicatrisation tissulaire après un phénomène ischémique) et à des phénomènes tumoraux.

En 1971 Forkman propose que la croissance tumorale et la dissémination métastatique sont dépendantes de l'angiogenèse, définie comme la formation de capillaires sanguins à partir d'un réseau préexistant [6, 7] et définit le concept du switch angiogénique.

L'angiogenèse est un processus multi-étapes comprenant l'initiation, la croissance et la maturation.

L'initiation, ou **switch** angiogénique en condition tumorale, est déclenchée par un facteur environnemental tel que l'hypoxie, qui a un rôle majeur dans l'induction de divers facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, NOS (***nitric oxide synthase***),

le PDGF, ou encore l'angiopoietine-2 (Ang-2). L'hypoxie exerce une influence directe sur la transcription de ces gènes, via le facteur de transcription HIF-1 (***hypoxia-inducible transcription factor***). D'autres facteurs d'initiation ont été décrits, tels que l'acidité du milieu, le métabolisme incluant notamment l'hyperglycémie, ou encore la réponse inflammatoire. L'activation des cellules endothéliales induite par ces facteurs de croissance aboutit à une néoangiogenèse qui se caractérise par la production de métalloprotéases qui détruisent la membrane basale, favorisent le détachement des péricytes et à la perte des jonctions intercellulaires, pour faciliter la migration des cellules endothéliales.

Ensuite, une phase de croissance permet la formation d'un nouveau réseau vasculaire et l'intervention de cellules spécialisées, les cellules *tip*, qui guident le branchement du réseau capillaire et adhèrent par des intégrines au milieu extracellulaire.

Enfin, la phase de maturation permet la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire et la mise en place des interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes, stabilisés entre autre sous le contrôle du PDGF et avec l'aide des protéines de jonction. Une fois les néovaisseaux recouverts de péricytes, ils restent fonctionnels même en l'absence de VEGF [8].

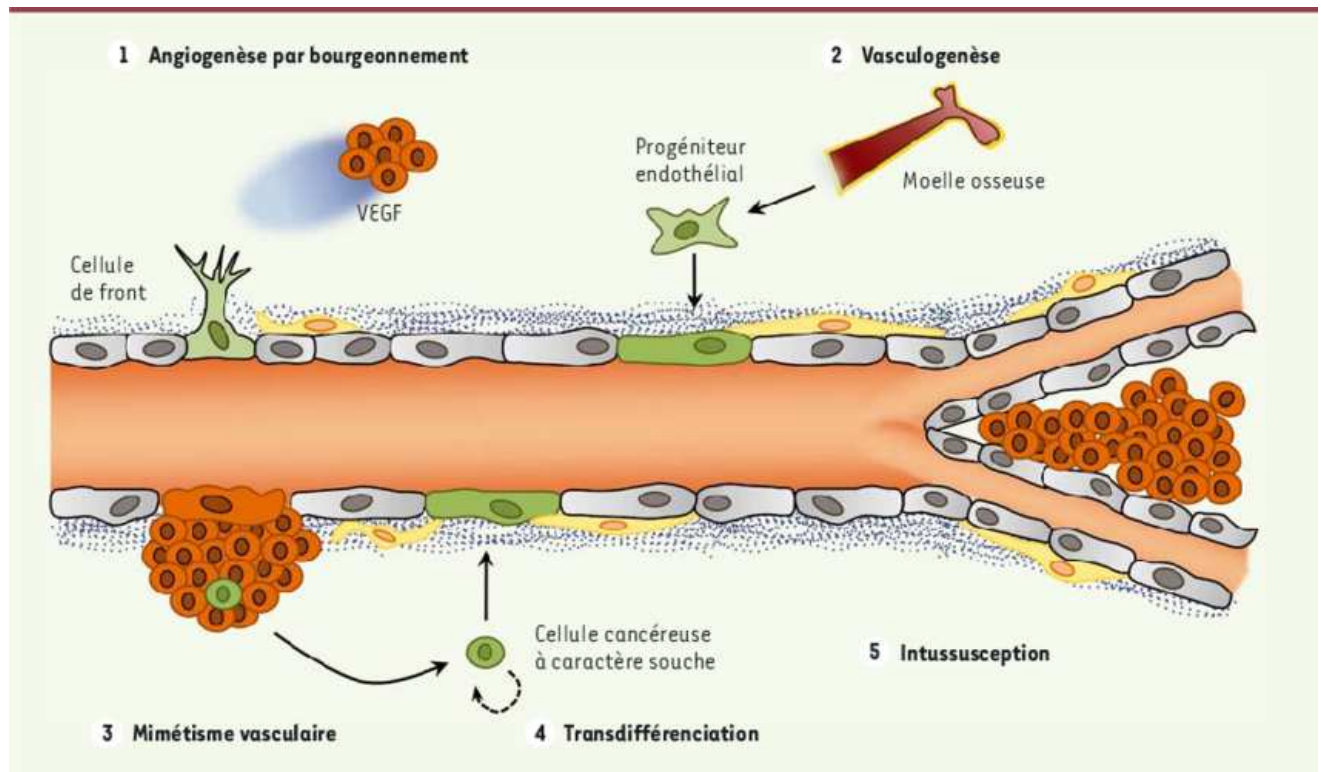


Figure 1 : Les différents modes de formation des vaisseaux tumoraux. 1.

L'angiogenèse par bourgeonnement qui dépend des gradients en VEGF conduisant à la sélection d'une ou plusieurs cellules de front. 2. Le recrutement de novo de précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse. 3. Le mimétisme vasculaire des cellules tumorales et l'incorporation directe de vaisseaux sanguins. 4. La transdifférenciation endothéliale de cellules tumorales à caractère souche. 5. La séparation d'un vaisseau sanguin par intussusception qui conduit à l'accroissement de la ramification des vaisseaux tumoraux. VEGF : vascular endothelial growth factor [9].

1.1. Concept du switch angiogénique :

C'est Folkman (1933-2008) qui en 1971 a observé que sans vaisseau, une tumeur ne pouvait pas grossir au-delà d'une taille critique (environ 2 mm) et ne pouvait pas métastaser à d'autres organes [6]. La présence de vaisseaux est indispensable pour la croissance tumorale et la diffusion métastatique.

Etape clé et fondamentale, l'angiogenèse est retrouvée au début du processus de la tumorigénèse et de l'implantation métastatique. Il serait possible de simplifier à l'extrême en disant que sans vaisseau, pas de cancer et pas de métastase, mais aussi pas de traitement systémique. Ce concept d'angiogenèse élaboré par Folkman puis confirmé par tous les travaux qui ont permis d'améliorer les connaissances liées à la tumorigénèse, a révolutionné l'oncologie moderne sur le plan théorique mais aussi, plus récemment, sur le plan thérapeutique avec l'émergence des thérapies ciblées. Au stade tout à fait initial de son développement, la tumeur est a-vasculaire et le sang périphérique suffit à sa croissance [10]. Mais très vite durant cette phase initiale de croissance, les cellules tumorales vont se situer au-delà de la zone de diffusion de l'oxygène (environ 200 μm) : l'hypoxie commence et avec elle, les cascades d'évènements pro-angiogéniques. L'angiogenèse tumorale s'organise selon le concept du *switch angiogénique*. Elle pourrait être comparée à une balance dont la position varie en fonction du poids des mécanismes pro-angiogéniques et de celui des mécanismes anti-angiogéniques.

Ce *switch* angiogénique peut être en « *on* » lorsque la balance est en faveur des mécanismes de l'angiogenèse ou en « *off* » lorsque l'effet des molécules anti-angiogéniques est dominant sur les molécules pro-angiogéniques [11]. Il existe de nombreux facteurs génétiques mais également métaboliques ou inflammatoires responsables de l'activation ou de l'inhibition de l'angiogenèse [11]. Par exemple, l'hypoxie et/ou l'activation d'oncogènes (comme RAS ou EGFR), vont stimuler l'activation de cytokines de l'angiogenèse (comme le VEGF) et d'enzymes protéolytiques (comme les métalloproteinases ou MMPs) et freiner les inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine : le *switch* se fait alors en faveur de l'angiogenèse dont les conséquences sont la croissance tumorale et la diffusion métastatique [12]. Il faut comprendre que la balance se fait en faveur d'un mécanisme au dépend d'un autre et qu'il existe donc une sorte de lutte entre la multitude de phénomènes impliqués. On sait que les molécules pro et anti-angiogéniques peuvent provenir non seulement des cellules tumorales elles-mêmes mais aussi des cellules endothéliales, des cellules du stroma, du sang et de la matrice extracellulaire [13]. Il faut imaginer que la cellule tumorale est noyée dans un environnement dont on sait aujourd'hui qu'il a une importance capitale et un rôle primordial dans la diffusion métastatique. Certains pensent que l'environnement péri-tumoral est au moins aussi important que la tumeur elle-même dans le processus de croissance et de diffusion.

L'angiogenèse tumorale et par voie de conséquence la croissance tumorale et sa capacité à métastaser, dépendent de multiples phénomènes dont certains génétiques et d'autres environnementaux. Si l'angiogenèse est indispensable et

déterminante à la croissance tumorale, elle est également fondamentale au stade métastatique lors de la colonisation de l'organe cible. L'un des principaux facteurs de l'angiogenèse est le VEGF [5].

1.2 VEGF et système immunitaire :

Parmi les différents facteurs pro-angiogéniques produits par la tumeur, le VEGF-A semble avoir un rôle central. [14, 15,16].

Ce facteur de croissance serait essentiellement impliqué dans l'angiogenèse, alors que ses isoformes VEGF-C et VEGF-D seraient, pour leur part, plutôt impliquées dans les phénomènes de lymphangiogenèse. [15,17, 18].

Le VEGF-A serait notamment produit par la tumeur lorsque cette dernière, arrivée à la taille critique, se trouverait en situation d'hypoxie. En effet, cette situation induit la production d'HIF- 1 (facteur induit par l'hypoxie), activateur de l'expression du VEGF.

Une fois produit, le VEGF-A se fixe sur son récepteur VEGFR-1 (encore appelé FLT1) ou sur le VEGFR-2 (OU FLK1) et peut alors exercer différentes actions.

Différents travaux ont mis en évidence qu'il induit notamment la perméabilité vasculaire, favorise la croissance et la survie des cellules endothéliales, leur migration et leur prolifération [16, 18].

Cependant la présence de récepteurs au VEGF a été identifiée au niveau de différentes cellules immunitaires myéloïdes et plus récemment lymphoïdes [19, 20]

chez les souris porteuses de tumeurs ou des patients atteints de cancer. Ceci suggérerait la possibilité que le VEGF puisse agir directement sur l'immunité.

Plus récemment, des travaux ont montré que l'angiogenèse pouvait entraîner une modulation des réponses immunitaires et participer à un basculement de la réponse immunitaire vers l'immunosuppression [21, 22].

Une des premières études montrant l'impact du VEGF sur l'immunité remonte aux années 1990, décrivant le fait que le VEGF pourrait inhiber la maturation des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques sont des cellules ayant un rôle majeur dans l'activité des lymphocytes T. En absence de maturation, elles sont dans l'incapacité d'activer les lymphocytes T, lesquels à leur tour, ne pourront pas détruire les cellules tumorales [19].

D'autre part, les cellules dendritiques immatures vont favoriser le développement de lymphocytes T régulateurs qui sont des cellules suppressives [23].

Il existe différentes preuves que le système immunitaire et l'angiogenèse seraient liés dans le processus tumoral.

Ces liens pourraient être bidirectionnels : le système immunitaire pouvant influencer l'angiogenèse et cette dernière pouvant moduler l'immunité [21].

Plus récemment, le VEGF serait apparu comme un facteur immunorégulateur responsable en partie de l'induction d'un microenvironnement immunosuppresseur au sein des tumeurs.

Le ciblage du VEGF pourrait donc permettre d'agir sur 2 voies indispensables au développement tumoral : l'angiogenèse, mais également l'échappement au système immunitaire [24].

L'administration de médicaments anti-angiogéniques a permis de montrer, dans différents modèles tumoraux, que le blocage de la voie VEGF / VEGFR permettrait :

- de rétablir la maturation des cellules dendritiques et d'améliorer leur fonction d'activation des lymphocytes T [19, 21, 22].
- d'améliorer l'infiltration des tumeurs par des lymphocytes T [25].
- d'empêcher l'accumulation de cellules immunosuppressives [19, 21, 22, 25].
- de lever l'épuisement des lymphocytes T [20].

Par la suite, il a été montré que le VEGF produit par la tumeur, mais également par les cellules infiltrant la tumeur, pourrait agir à d'autres niveaux et bloquer l'induction d'une réponse immunitaire efficace [19, 20].

Le VEGF diminuerait le recrutement des lymphocytes effecteurs par la tumeur en diminuant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales [27].

1.3. Principe du ciblage anti-angiogénique : [28]

La première approche consiste à bloquer les facteurs angiogéniques ou leurs récepteurs car l'activation de l'angiogenèse résulte d'une modification de l'équilibre entre facteurs angiogènes et facteurs angiostatiques. Parmi plus de 40 molécules endogènes actuellement décrites comme des activateurs ou des inhibiteurs de l'angiogenèse, la famille du VEGF a été la première ciblée compte tenu de son rôle central dans l'angiogenèse. Expérimentalement, dans des modèles de xenogreffe, les anticorps dirigés contre le VEGF ou ses récepteurs inhibent la croissance du carcinome gastrique.

Toute l'inhibition de plusieurs facteurs angiogéniques de façon simultanée semblerait être la meilleure stratégie pour s'affranchir des mécanismes de compensation de la tumeur, par augmentation d'autres facteurs pro-angiogéniques. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant notamment la voie de signalisation du VEGF et FGF-2 chez les souris présentant un carcinome colique métastatique, améliore leur survie.

Une seconde approche est l'utilisation de médicaments ciblant la prolifération ou la survie des cellules endothéliales. Certaines molécules anti-angiogéniques, comme l'endostatine, exprimées naturellement par la tumeur ont fait l'objet de travaux qui ont montré qu'elles pouvaient inhiber la croissance tumorale dans des modèles murins.

La troisième approche est l'utilisation des molécules qui préviennent la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Ainsi des inhibiteurs de la

matrix métallo protéinase -9 (MMP -9) réduisent la vascularisation des xénogreffes chez la souris.

La dernière approche a pour cible les molécules d'adhérence cellulaire, comme les intégrines.

1.4. Avantages théoriques et limites pratiques de la stratégie anti-angiogénique :

Les cellules endothéliales, qui composent l'endothélium tumoral présentent un phénotype proliférant dit « angiogénique », alors que celles de l'endothélium sain sont dans un état dit « quiescent ». Les thérapies anti-angiogéniques ciblent l'angiogenèse tumorale et devraient donc, en théorie, avoir très peu d'effet sur l'angiogenèse physiologique, et par conséquent générer peu d'effets secondaires.

De plus, elles peuvent être utilisées dans la plupart des cancers car elles ne sont pas spécifiques d'une localisation tumorale, même si les cancers les plus vascularisés ont un meilleur taux de réponse.

2. Les thérapies ciblées anti angiogéniques :

Depuis de nombreuses années, la possibilité d'utiliser un médicament spécifique d'une cible en lien avec une pathologie est connue dans de nombreux domaines thérapeutiques (ex. hypertension artérielle, antibiothérapie...). Le terme « thérapie ciblée » est récent, et semble être préférentiellement utilisé dans le cancer et les maladies inflammatoires chroniques [29]. Les thérapies ciblées sont une nouvelle classe de médicaments contre le cancer, dont le mécanisme d'action est différent de

celui des chimiothérapies anticancéreuses classiques. Leur dénomination “thérapies ciblées” (“targeted therapies” en anglais, de target = cible) fait référence à ce mécanisme d'action plus spécifique.

Elles sont dirigées contre les facteurs de croissance et leurs récepteurs ou les mécanismes de transduction des signaux de prolifération (figure 4).

VEGF et VEGF-R's

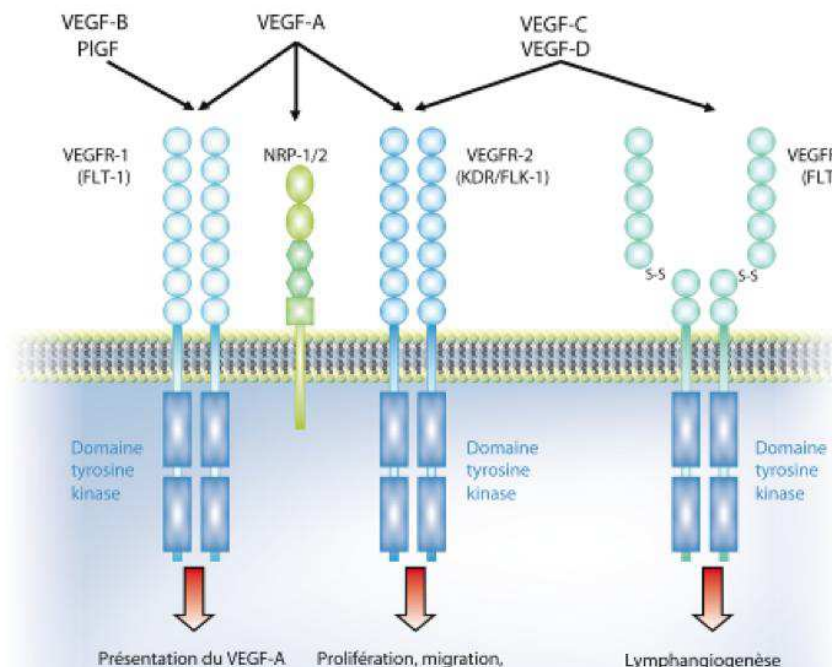


Figure 2 : récepteurs et voies de transduction des signaux de prolifération

*Feige, « L'angiogenèse », p.7 coll.
Application Médicale du Gène, 2009
John LibbeyEurotext*

Elles inhibent le fonctionnement précis d'une voie moléculaire considérée comme nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. Généralement, le niveau d'activation de ces voies moléculaires est plus élevé dans les cancers que dans les tissus normaux. Cela se traduit généralement par des effets secondaires moins marqués qu'avec les autres traitements contre le cancer. Ces traitements ciblés ne sont pas pour autant toujours exempts d'effets secondaires indésirables.

Les thérapies ciblées sont l'aboutissement de nombreuses années de recherche fondamentale en cancérologie, dont les résultats ont été traduits grâce à la recherche translationnelle, passerelle entre recherche fondamentale et recherche appliquée en clinique. C'est un domaine en constante évolution, et de nouvelles thérapies ciblées sont régulièrement découvertes. Les thérapies ciblées peuvent être classées dans deux grands groupes :

- Les “petites molécules” (chimiques), dont les inhibiteurs de tyrosine kinase : elles ont un nom qui se termine par ‘-ib’, pour “inhibiteur”. Ces petites molécules peuvent traverser la membrane cellulaire et venir inhiber les cascades d'activation des processus cancéreux à l'intérieur de la cellule.

Elles bloquent principalement les voies de signalisation, représentées en particulier par les inhibiteurs de tyrosines kinases (exemples : imatinib, erlotinib, vismodegib, sorafénib, regorafenib etc), mais aussi par des inhibiteurs de mammalian Target of Rapamycin (protéine cible de la rapamycine, c'est-à-dire le sirolimus [mTOR] l'everolimus) ou des immuno-modulateurs.

- Les “grosses molécules” (bio médicaments), molécules de poids moléculaire élevé : elles ont un nom qui se termine en ‘-mab’. Il s’agit d’anticorps monoclonaux. Ces molécules sont capables de reconnaître sélectivement les cellules cancéreuses et de s’y fixer, mais elles ne peuvent pas traverser la membrane cellulaire.

Les bio-médicaments sont produits notamment par génie génétique. Ce sont pour la plupart des anticorps monoclonaux (exemple : le trastuzumab, le bévacizumab, le cetuximab, etc), mais aussi des protéines de fusion, possédant la fraction extracellulaire d’un récepteur membranaire comme l’aflibercept. Ces anticorps monoclonaux sont administrés par voie intraveineuse ou sous cutanée, ont un poids moléculaire élevé, une longue demi-vie d’élimination, une cible généralement extracellulaire. Ces médicaments font intégralement partie des traitements standards utilisés contre les différents types de cancers. Beaucoup d’autres sont encore en développement, et font actuellement l’objet d’études cliniques.

2.1. Les différentes stratégies d’inhibition de la prolifération tumorale

La thérapie ciblée peut agir à différents niveaux :

- 1) L’anticorps se lie au ligand. Le ligand spécifique ne pourra pas se fixer au domaine de liaison du récepteur.
- 2) L’anticorps se lie au récepteur. Le ligand ne pourra pas se lier au récepteur car le site de liaison du récepteur n’est plus accessible.
- 3) Des inhibiteurs enzymatiques bloquent la transduction du signal générée par la liaison du ligand sur le récepteur.

Dans les trois cas, la prolifération tumorale est inhibée.

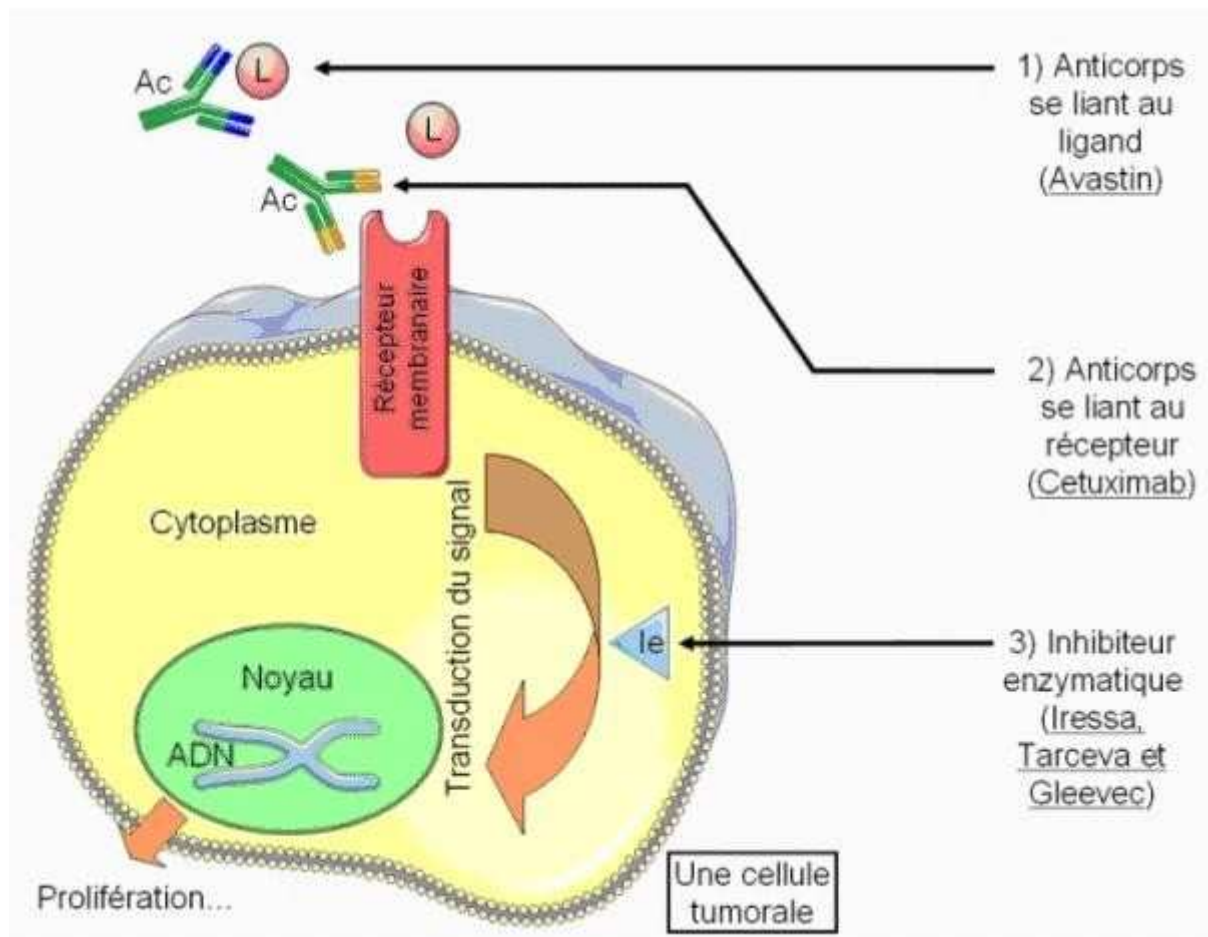


Figure 3 : La lutte contre le cancer. Thérapie ciblée : une révolution médicale ?
[30]

2.2. Mécanismes d'action des thérapies ciblées anti-angiogéniques :

Les médicaments anti-angiogéniques ont été initialement développés dans l'idée d'inhiber le processus d'angiogenèse tumorale en ciblant essentiellement les cellules endothéliales. Il est devenu de plus en plus évident, cependant, que l'efficacité thérapeutique associée à la thérapeutique ciblée du VEGF est de nature complexe et implique probablement de multiples mécanismes. Les travaux de Jain [31] ont conduit à formuler l'hypothèse que les traitements anti-angiogéniques permettraient de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter ainsi l'accès des agents chimiothérapeutiques aux tumeurs. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi le bévacizumab, anticorps anti-VEGF, est inefficace en monothérapie pour des tumeurs plus ou moins chimiosensibles comme les cancers colorectaux, alors qu'en association à la chimiothérapie, il montre une efficacité en termes de taux de réponse de survie sans progression ou même de survie globale. Cette notion reste toutefois discutée et ne peut expliquer à elle seule l'action du bévacizumab.

Le blocage du VEGF induirait également des modulations de la réponse immunitaire en levant la réponse sur la différenciation des cellules dendritiques conduisant à une meilleure présentation des antigènes tumoraux par le système immunitaire. Deux approches pharmacologiques visant à limiter l'angiogenèse tumorale sont actuellement utilisées. Elles inhibent principalement la voie du VEGF grâce à l'utilisation d'inhibiteurs monospécifiques des voies angiogéniques et à celle de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des récepteurs du VEGF.

L'inhibiteur le plus connu est l'anticorps monoclonal humanisé bévacizumab (Avastin®). Il cible spécifiquement un épitope du VEGF A l'empêchant d'interagir avec son récepteur, le VEGF-R2, bloquant ainsi la cascade de signalisation propre à l'angiogenèse tumorale. Le fragment F (ab') 21 de cet anticorps, le ranibizumab (Lucentis®) [6], est également utilisé dans les pathologies oculaires de par sa meilleure pénétrabilité au niveau de la rétine, dans les cas de dégénérescence maculaire.

Une autre stratégie consistant à cibler les récepteurs du VEGF est efficace dans le traitement du cancer colorectal, du lymphome et du cancer du rein. Ainsi, le VEGF-TRAP (Aflibercept, Zaltrap®) qui est une protéine recombinante de fusion qui comporte les domaines des récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2, inhibe le VEGF A mais également le VEGF B et le PlGF [12].

Le sorafénib (Nexavar®) inhibe les kinases Raf et cible ainsi les voies de signalisations dépendant des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) et la voie Raf/MEK (*MAPK/ERK kinase*)/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). Il interagit également avec les récepteurs VEGF-R2 et R3, PDGFR-B, et c-kit.

Le sorafénib, qui est un inhibiteur de type II, agit directement sur la protéine kinase en la bloquant dans une conformation inactive [32].

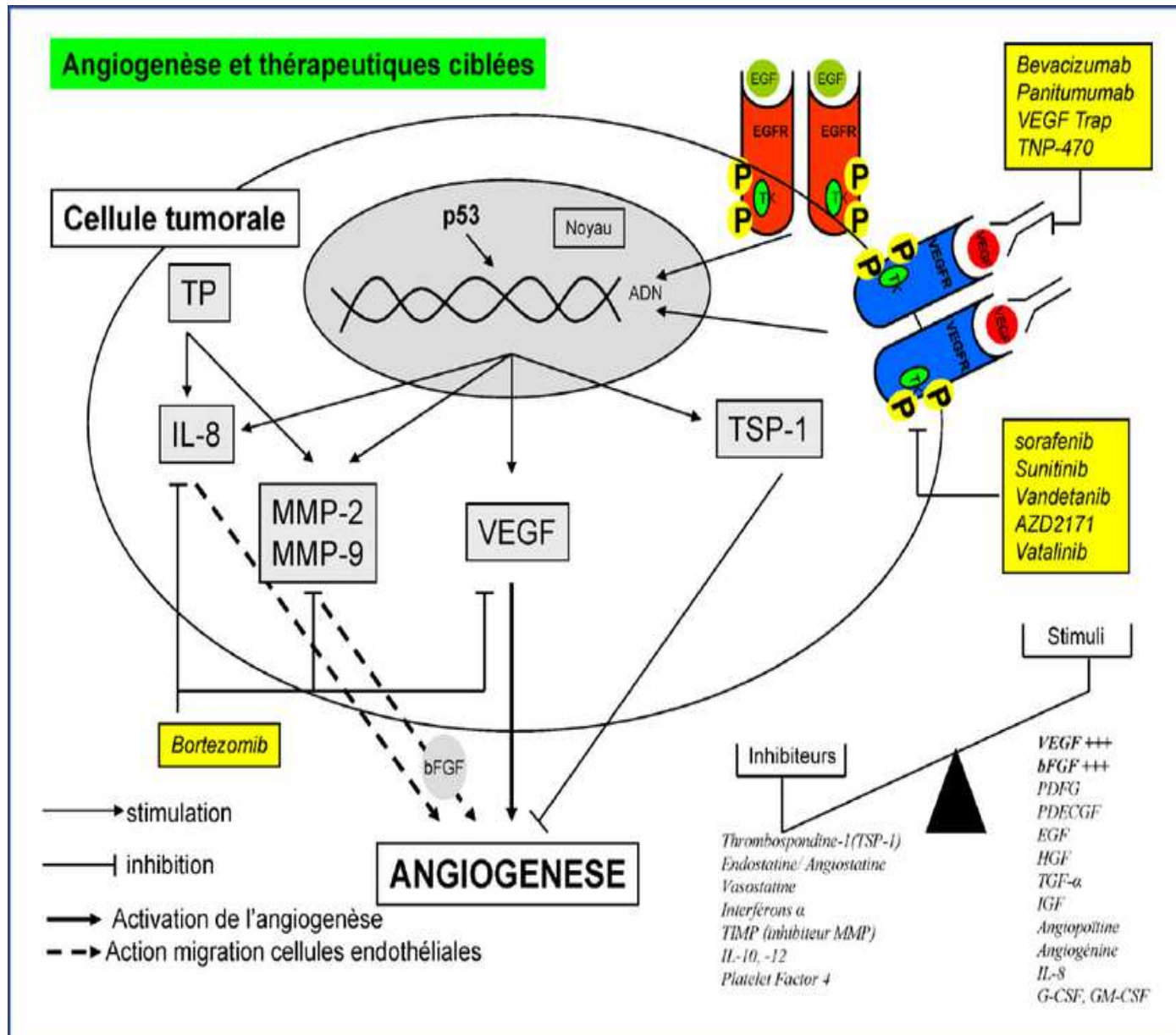


Figure 4 Schéma de la voie de transduction impliquant EGFR et les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la progression tumorale (Ras/Raf/MAPK, PI-3K/AKT, JAK/STAT et PLC_/PKC) ainsi que les différentes thérapies ciblées disponibles.

[33]

2.3. Toxicité des thérapies ciblées anti-angiogéniques :

L'inhibition de la voie du VEGF a des conséquences physiologiques sur la régulation artérielle endothéliale, en particulier dans les zones peu vascularisées. Les effets concernent l'ensemble de l'arbre artériel, depuis les grosses artères jusqu'à la microcirculation. Ces toxicités vasculaires sont dominées essentiellement par l'hypertension artérielle (HTA). Des cas d'hémorragies, en particulier des épistaxis bénins sont possibles, facilités par l'association au 5-fluorouracile. De rares toxicités endothéliales directes se manifestent par des thromboses (embolies artérielles, périphériques, accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde) [13].

Une insuffisance cardiaque est possible, d'où l'utilité d'un bilan cardiologique avec évaluation de la FEVG avant l'initiation du traitement.

L'asthénie sous traitement anti-angiogénique est une plainte fréquente et doit faire rechercher : une anémie, une carence en folates ou en vitamine B12, une hypothyroïdie, ou une dépression.

La toxicité rénale peut se limiter à une protéinurie asymptomatique. Une protéinurie supérieure à 3 grammes par jour doit faire interrompre le traitement par anti-angiogénique, de même que la survenue d'une insuffisance rénale.

L'anorexie, l'agueusie et la perte de poids sont fréquentes. Un avis diététique peut être utile.

La mucite est fréquente et peut être prévenue par des bains de bouche.

La diarrhée, fréquente, est facilement contrôlée par les antidiarrhéiques symptomatiques.

Des perforations intestinales sont possibles, parfois létales et sont à suspecter en cas de survenue d'un syndrome douloureux abdominal.

Une toxicité cutanée qui se manifeste par une sécheresse de la peau, des rashes, des prurits, et des érythèmes. L'utilisation de crèmes hydratantes et de crèmes à l'urée est recommandée.

Une toxicité neurologique avec des paresthésies douloureuses et invalidantes des paumes et des plantes des pieds peut être observée. Des semelles orthopédiques absorbantes répartissant bien les pressions peuvent être utiles.

Des cas d'encéphalopathies postérieures ont été observés : céphalées intenses, troubles visuels, crises convulsives, hypertension intra crânienne. L'arrêt immédiat du traitement est impératif.

Les atteintes hématologiques sont rares [34].

2.4. Exemples de thérapies ciblées anti-angiogénique :

Bévacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal qui se lie à ses récepteurs situés à la surface des cellules des vaisseaux. Son utilisation montre une réduction de la croissance des micro-vaisseaux. Le bévacizumab est utilisé dans le traitement du cancer du côlon et du rectum, dans ceux du sein et du poumon, du cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif. Il existe un bénéfice dans le cancer du rein métastatique tout comme le *sutent* ou le *sorafénib* (autre thérapie ciblée), ce qui représente un progrès pour cette tumeur qui n'avait guère de traitement il y a encore quelques années une fois devenue métastatique.

Aflibercept (ZALTRAP®) également connu sous le nom de VEGF TRAP dans la littérature scientifique, est une protéine de fusion recombinante constituée de fragments se liant au VEGF, issus des domaines extracellulaires des récepteurs VEGF humains 1 et 2, fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. L'aflibercept agit comme un récepteur - leurre soluble qui se lie au VEGF-A, avec une plus haute affinité que ses récepteurs natifs, ainsi qu'aux ligands apparentés PlGF et VEGF-B. En agissant comme piège à ligand, l'aflibercept empêche la liaison des ligands endogènes à leurs récepteurs apparentés et, de ce fait, bloque la signalisation médiée par le récepteur. L'aflibercept bloque l'activation des récepteurs du VEGF et la prolifération des cellules endothéliales, inhibant ainsi la croissance des nouveaux vaisseaux qui alimentent les tumeurs en oxygène et nutriments. Il est indiqué chez l'adulte en association avec la chimiothérapie irinotécan/5-fluorouracile/acide

folinique(FOLFIRI) dans le traitement du cancer colorectal métastatique (CCRm) résistant ou ayant progressé après un traitement à base d'oxaliplatine.

Sorafénib (NEXAVAR®) est un inhibiteur de protéines kinases multicibles administré par voie orale. Le sorafénib inhibe l'activité des cibles présentes dans les cellules tumorales (CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, et FLT-3) et freine la vascularisation tumorale (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR- β). Il est utilisé dans le carcinome rénal avancé, dans le CHC avancé et dans le carcinome thyroïdien.

Régorafenib (STIVARGA®) est un inhibiteur de protéines kinases multicibles administrée par voie orale. Il inhibe l'activité des kinases impliquées dans l'angiogenèse tumorale (VEGFR1, 2, 3, TIE2), l'oncogenèse (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF^{V600E}) et le micro-environnement tumoral (PDGFR, FGFR). Il est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un cancer colorectal métastatique (CCRm), en échec de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, d'un traitement par anti-VEGF, ou par anti-EGFR (si le cancer exprime le gène KRAS non muté [type sauvage]).

2.5. Résistance aux thérapies ciblées anti-angiogéniques :

Bien que l'utilisation des agents anti-angiogéniques ait été considérée comme une stratégie prometteuse qui permet de bloquer la croissance tumorale et d'améliorer la biodisponibilité des médicaments jusqu'à la tumeur, l'utilisation en clinique de la plupart de ces agents s'avère limitée du fait du développement de la résistance à certains de ces anti-angiogéniques et de leur importante toxicité [32].

Les cellules endothéliales présentes au sein de la tumeur et soumises aux traitements anti-angiogéniques (anti-VEGF ou inhibiteurs de tyrosine kinases) en association avec une chimiothérapie, peuvent, après une première réponse, développer une résistance aux agents anti angiogéniques par le biais de l'hypoxie, des voies alternatives de la néoangiogenèse, en stimulant des facteurs angiogéniques autres que le VEGF (le *fibroblaste growth factor-2* [FGF2] , le *stromal derived factor-1* [SDF-1], le *stem cell factor* [SCF], le *placenta growth factor* [PIGF], l'interleukine-6 [IL-6]), ou via le facteur *hypoxic inducible factor* (HIF-1) qui les stimulent. D'autres voies, indépendantes de la néoangiogenèse, peuvent également prendre le relais par le recrutement de précurseurs endothéliaux ou par la stimulation de certaines voies de signalisation, en général impliquées dans l'invasion tumorale [35].

La participation des progéniteurs endothéliaux à la résistance aux agents anti-angiogéniques fait intervenir plusieurs voies potentielles. Les marqueurs moléculaires relatifs à la néoangiogenèse sont à considérer, ,comme le VEGF et ses

récepteurs (VEGFR1/2), le degré de différenciation des progéniteurs ainsi que l'infiltration de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (LT8) dans la tumeur et, plus généralement, leur interaction avec les autres cellules présentes dans la tumeur. Plusieurs voies sont possibles. Elles font intervenir les pompes à efflux et autres échanges membranaires avec les cellules tumorales, la séquestration des drogues par les lysosomes ou la stimulation de voies de signalisation comme le *MNNG HOS transforming gene* (c-Met), la protéine kinase B (AKT) ou le *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [32]. Il a été récemment montré que l'ABCB1 était présent sur les cellules HMEC (human microvascular endothelial cell) traitées à la doxorubicine [36]. Ces pompes sont en effet exprimées à la surface des cellules endothéliales isolées de xénogreffes tumorales humaines (lignée MDA-MB-435) dans des souris nude (dépourvues de système immunitaire) prétraitées avec des petites doses de doxorubicine avant la greffe [36]. Ces cellules endothéliales, traitées à la doxorubicine et exprimant ABCB1, présentent des résistances croisées aux agents de chimiothérapie comme l'étoposide (Vépéside® ou Etopophos® ou Celltop®), mais également au sunitinib [37, 38].

De plus, les cellules endothéliales, présentes au sein d'une tumeur, sont résistantes à l'absence de sérum dans le milieu, ce qui n'est pas le cas des cellules endothéliales normales. Dans certains cas, les cellules isolées sont résistantes aux agents de chimiothérapie et des pompes de type *ATP-binding cassette*, CFTR/MRP, ABCC1 et ABCB1, ont été mises en évidence sur des cellules précurseurs exprimant les marqueurs CD90, CD105 et CD133 [39]. Une fraction de précurseurs endothéliaux peut donc contribuer à l'acquisition d'une résistance de la tumeur aux

différents traitements de chimiothérapie ou anti-angiogéniques. Des études récentes montrent en outre que le VEGF est capable de stimuler l'expression des pompes ABCB1 *via* la voie Akt (protéine kinase B) [39].

En effet, l'hétérogénéité des tumeurs mais aussi le polymorphisme qui existe pour les gènes codant le VEGF et ses récepteurs, constituent une partie importante de la variabilité observée dans les réponses aux traitements [40].

L'origine des cellules endothéliales tumorales s'avère multiple. Elles peuvent provenir de cellules endothéliales préexistantes mais également de précurseurs endothéliaux et/ou de cellules tumorales qui mimeraient ces cellules et d'une niche de cellules mésenchymateuses et myéloïdes induisant différentes voies de l'angiogenèse. Cette multi-origine, de même que la plasticité de ces cellules, semblent contribuer fortement à l'acquisition de la résistance aux agents anti-angiogéniques [32].

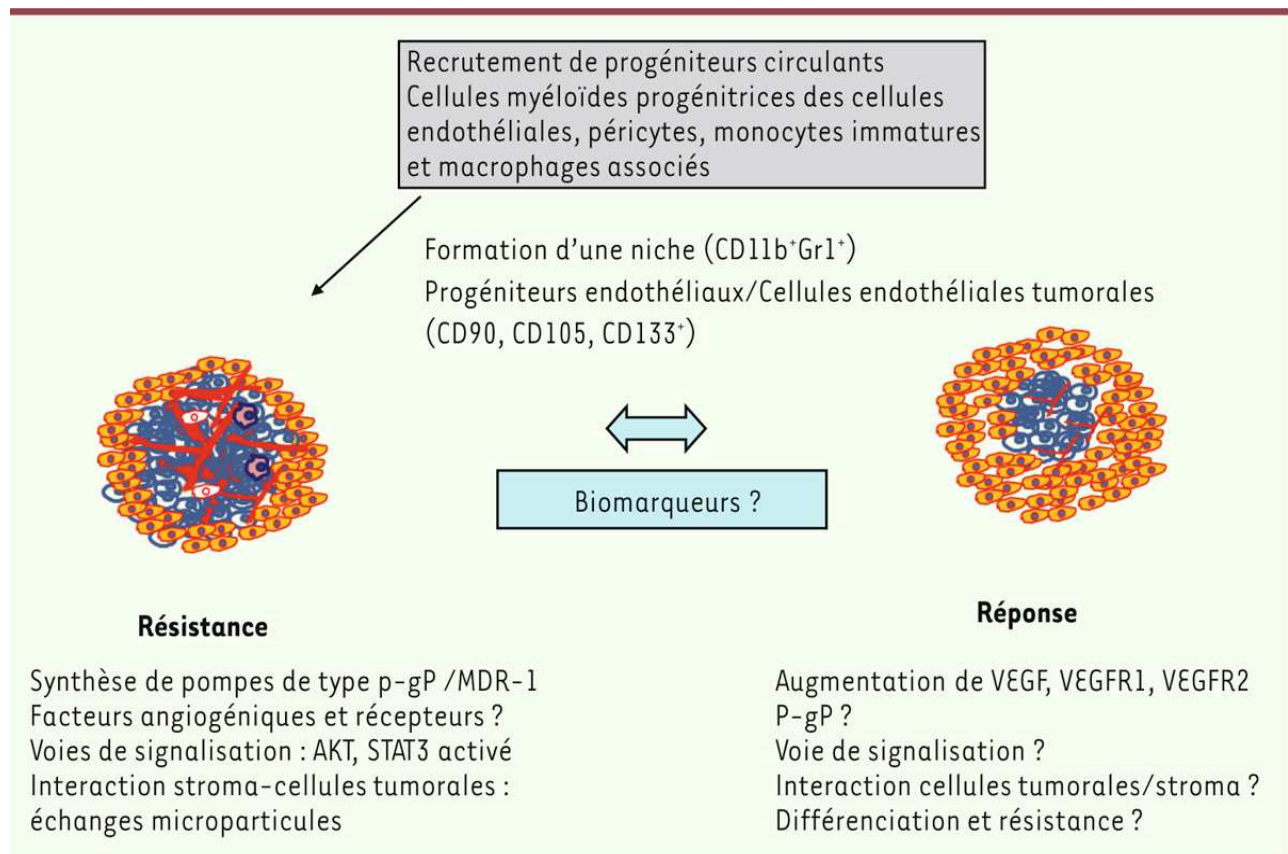


Figure 5. Les mécanismes de résistance de la cellule endothéliale aux agents anti-angiogéniques.

Chapitre II : Transporteurs membranaires et polymorphismes génétiques

1. Transporteurs membranaires :

La plupart des membranes cellulaires des mammifères comporte des systèmes de transport permettant d'importer dans la cellule les substances endogènes et exogènes dont elles ont besoin et d'exporter celles qui doivent en être éliminées.

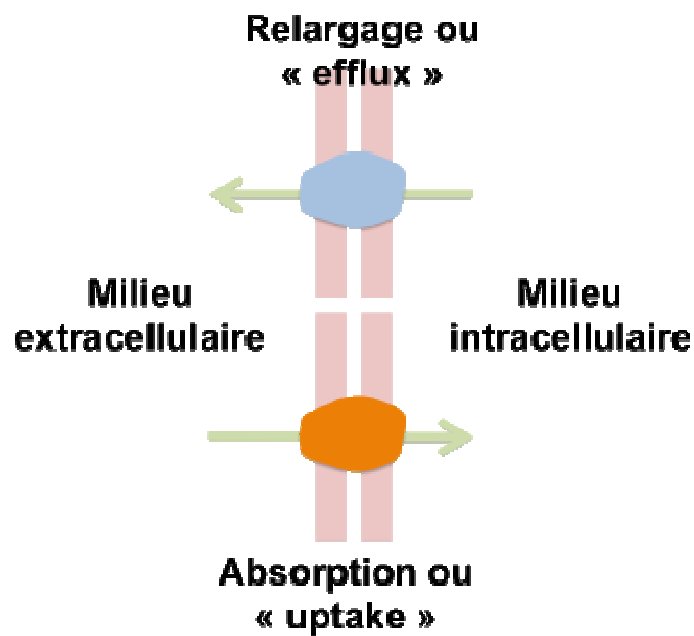


Figure 6 : Absorption et relargage au niveau de la membrane cellulaire

Ces transporteurs sont impliqués dans le trafic cellulaire des neuromédiateurs, des hormones et de diverses substances endogènes comme les ions, les glucides, les lipides ou les acides aminés, et jouent un rôle homéostatique majeur pour le fonctionnement cellulaire et l'équilibre des processus physiologiques. À ce titre, le dysfonctionnement des transporteurs est à l'origine de maladies parfois sévères comme la mucoviscidose, la maladie de Tangier ou certaines cholestases intrahépatiques familiales progressives, ou moins graves comme le syndrome de Dubin-Johnson.

Chez l'homme, quelques-uns de ces transporteurs ont un rôle important en pharmacocinétique, car ils sont impliqués dans les différentes étapes de l'Administration, de la Distribution du Métabolisme et de l'Elimination (ADME). D'un point de vue cinétique, les transporteurs peuvent être divisés en transporteurs d'influx, qui favorisent l'entrée du médicament dans la cellule, et en transporteurs d'efflux, qui favorisent la sortie du médicament ou de ses métabolites formés dans la cellule [41]. Le circuit général d'un médicament dans l'organisme fait apparaître une coopération étroite entre le métabolisme et les processus de transport.

LES 4 TYPES DE TRANSPORTS MEMBRANAIRES

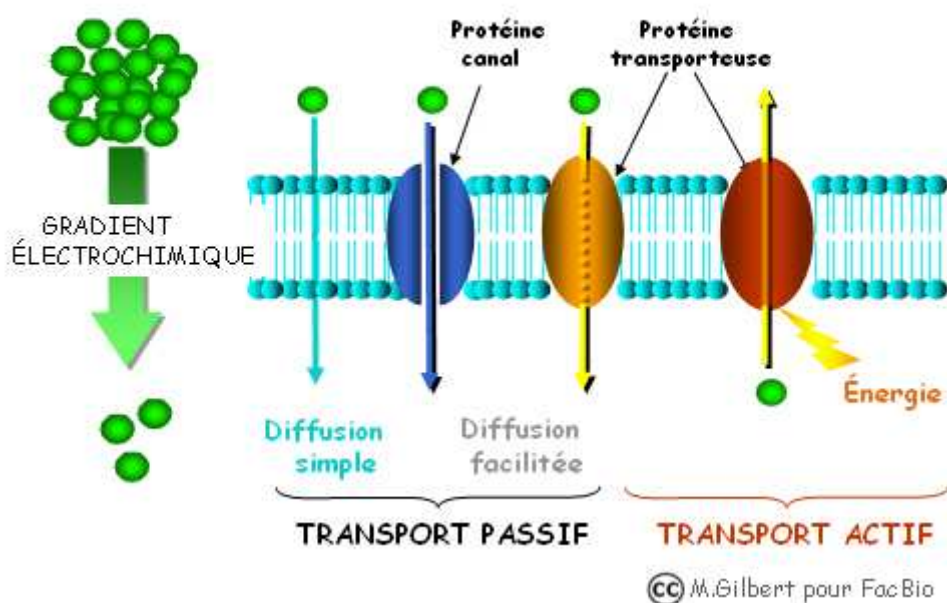


Figure 7 : Les 4 types de transports membranaires

Selon un schéma général classique, les médicaments absorbés au niveau du tube digestif sont captés par les hépatocytes, au niveau desquels ils subissent (ou pas) des biotransformations, et peuvent être excrétés dans la bile ou retourner dans la circulation sanguine pour être distribués aux différents organes puis éliminés, le plus souvent par les urines. L'expression des transporteurs au niveau de la membrane de cellules-cibles comme les lymphocytes ou les cellules tumorales, fait que ces protéines jouent également un rôle majeur dans l'échappement thérapeutique et sont l'une des causes de la pharmaco-résistance que l'on rencontre notamment avec les médicaments antiviraux ou anticancéreux.

Les cellules polarisées du foie ou des tubules rénaux expriment au niveau de leur membrane basolatérale ou apicale divers types de transporteurs d'influx ou d'efflux. Selon leur localisation et le sens du transport, ces transporteurs facilitent ou, au

contraire, limitent le passage des médicaments à travers les cellules. Au niveau hépatique, les transporteurs exprimés au pôle sinusoidal ont pour fonction principale d'extraire les substances présentes dans le sang, tandis que les transporteurs du pôle canaliculaire les excrètent dans la bile. Les transporteurs tubulaires rénaux permettent les échanges entre le sang et l'urine, soit dans le sens d'une excrétion, soit dans celui d'une réabsorption des substances filtrées.

2. Transporteurs exprimés au niveau hépatique :

Les transporteurs d'influx exprimés sur le pôle basal des hépatocytes appartiennent pour la plupart à la superfamille SLC (solute carrier transporters) et les principaux représentants à ce niveau sont les Transporteurs Polypeptidiques d'Anions Organiques (OATP1B et 2B), les transporteurs d'anions organiques (OAT2) et les transporteurs de cations organiques (OCT1). Les transporteurs d'efflux exprimés à la membrane canaliculaire des hépatocytes sont les *ATP-binding cassettes* (ABC) des familles ABCB, ABCC et ABCG et le transporteur MATE1 de la superfamille SLC.

2.1. Transporteurs d'influx :

Les transporteurs SLC participent à l'absorption cellulaire des xénobiotiques (uptake). Les transporteurs SLC sont des transporteurs actifs secondaires ou indirects. Ils n'utilisent pas directement l'ATP, mais l'énergie produite par une différence de potentiel électrochimique (un gradient d'ions) créé par un transport actif primaire. Les SLC sont des échangeurs qui fonctionnent en mode uniport (un seul composé est transporté), antiport (le composé est transporté dans le sens inverse du

gradient ionique) ou symports (deux composés sont transportés simultanément, ce système est également appelé cotransport). Le mode antiport implique un échange entre 2 acides organiques, l'un pénétrant dans la cellule tandis qu'un autre en sort. Les médicaments sont le plus souvent substrats dans le sens de l'entrée dans la cellule, c'est pourquoi, en pharmacologie, ces transporteurs peuvent généralement être considérés comme des transporteurs d'influx.

Les protéines OATP transportent une grande variété de médicaments [42].

OATP1B1 et 1B3 transportent notamment les statines, la rifampicine, le méthotrexate, certains IEC et la fexofénadine ; OATP1B3 transporte également la digoxine et des taxanes, tandis que OATP2B1 transporte un nombre plus limité de médicaments parmi lesquels les statines, la fexofénadine et la benzylpénicilline.

Le transport d'autres anions organiques par les hépatocytes repose sur la protéine OAT2 qui est impliquée dans le transport de molécules endogènes (prostaglandines, glutarate), mais aussi de médicaments parmi lesquels le méthotrexate, l'acide valproïque et l'allopurinol.

Les protéines OCT sont des transporteurs de cations organiques, c'est-à-dire de molécules chargées positivement au pH physiologique. La protéine OCT1 transporte des médicaments comme la metformine, le vérapamil, la quinine, des anti-H2 (cimétidine, ranitidine), certains antiviraux (aciclovir, zalcitabine) et le cisplatine.

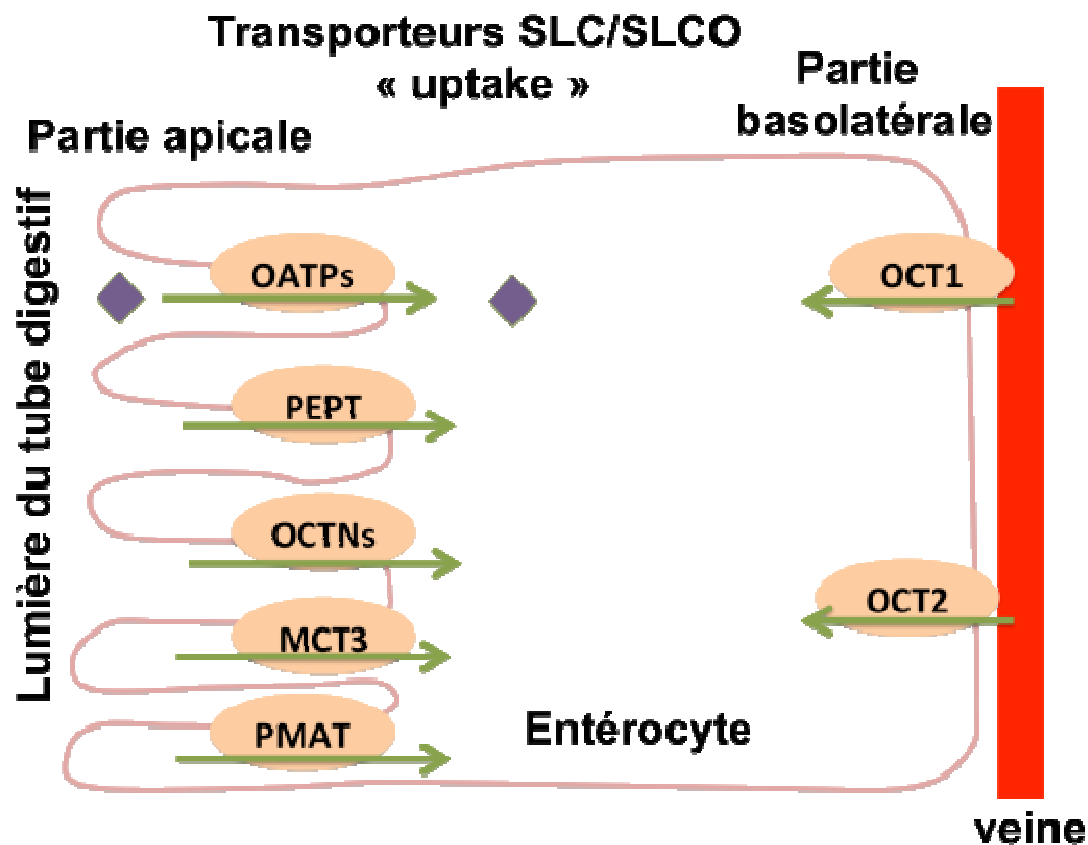


Figure 8 : Localisation des transporteurs SLC dans une cellule polarisée

2.2. Transporteurs d'efflux :

Les protéines de la superfamille ABC utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des substrats du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, le plus souvent contre un gradient de concentration.

Le transporteur MDR1 ou P-glycoprotéine (P-gp), codé par le gène ABCB1, est physiologiquement impliqué dans l'efflux de très nombreux toxiques et médicaments [42]. Il est présent au pôle canaliculaire des hépatocytes, mais aussi au niveau d'autres barrières clés de l'organisme (intestin, rein, barrière hématoencéphalique).

Les transporteurs MDR3 (gène ABCB4) et BSEP (gène ABCB11) sont impliqués dans le transport canaliculaire des sels biliaires, de certains phospholipides (phosphatidylcholine) et de quelques médicaments (digoxine, paclitaxel, vinblastine). Ils sont par ailleurs impliqués dans certaines cholestases médicamenteuses relevant d'un mécanisme compétitif.

Les transporteurs MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*) sont impliqués dans l'efflux d'anions organiques endogènes tels que les sels biliaires, et dans celui de médicaments conjugués (au glutathion ou à des groupements sulfate ou glucuronate). Ils sont différemment localisés sur la membrane hépatocytaire : MRP3 (gène ABCC3), MRP4 (gène ABCC4) et MRP6 (gène ABCC6) sont situés sur la membrane basolatérale où ils permettent le retour des substances depuis les hépatocytes vers le sang, tandis que MRP2 (gène ABCC2) et BCRP (ABCG2) sont localisés au niveau apical et contribuent à l'excrétion biliaire de leurs substrats.

Le transporteur MATE-1 (*Multidrug And Toxin Extrusion protein 1*), situé au pôle canaliculaire des hépatocytes, est, malgré son appartenance à la superfamille des SLC, une protéine d'efflux. Certains composés sulfoconjugués endogènes, tels que le sulfate d'estrone, sont des substrats de ce transporteur. L'oxaliplatine, la cimétidine et la metformine sont des substrats exogènes.

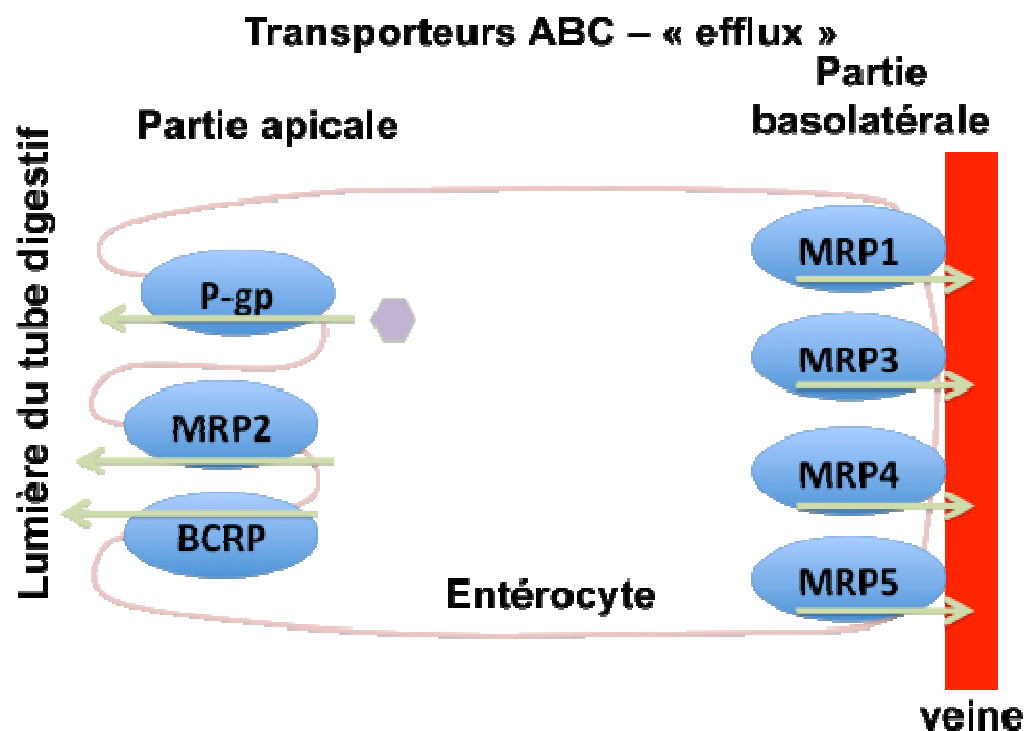


Figure 9 : Localisation des transporteurs ABC dans une cellule polarisée

3. Pharmacogénétique et variations du métabolisme et du transport des médicaments :

Les médicaments représentent une part importante des substances chimiques étrangères à l'organisme, encore appelés xénobiotiques, auxquels l'homme est exposé en permanence. Ils sont généralement de nature hydrophobe et doivent être métabolisés en composés hydrophiles pour être plus facilement éliminés dans la bile et dans les urines [43]. Une représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques est proposée en *figure 10*. Après administration, les médicaments doivent pénétrer dans le compartiment vasculaire pour atteindre leur cible, en franchissant la barrière intestinale, au niveau de laquelle il existe des transporteurs

destinés à les expulser (Phase 0 du métabolisme, représentée par exemple par la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1* ou *ABCB1*). Le métabolisme est ensuite principalement hépatique et les enzymes qui participent à la biotransformation des médicaments sont schématiquement divisées en deux groupes :

- 1) les enzymes de phase I sont des enzymes de fonctionnalisation (oxygénases, oxydoréductases, hydrolases), qui rendent les molécules plus polaires (par hydroxylation ou désalkylation par exemple). Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 catalysent la grande majorité des réactions de phase I ;
- 2) les enzymes de phase II sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison, et rendent les métabolites encore plus hydrophiles, par greffage d'un radical acétyl, sulfate, glucuronate, méthyle, glutathion. Enfin, pour être éliminés hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par des protéines de phase III, qui appartiennent à la même famille que la P-gp : les protéines ABC (*ATPbinding cassette* : par exemple ABCC1 ou MRP1 dans l'ancienne nomenclature, ABCC2).

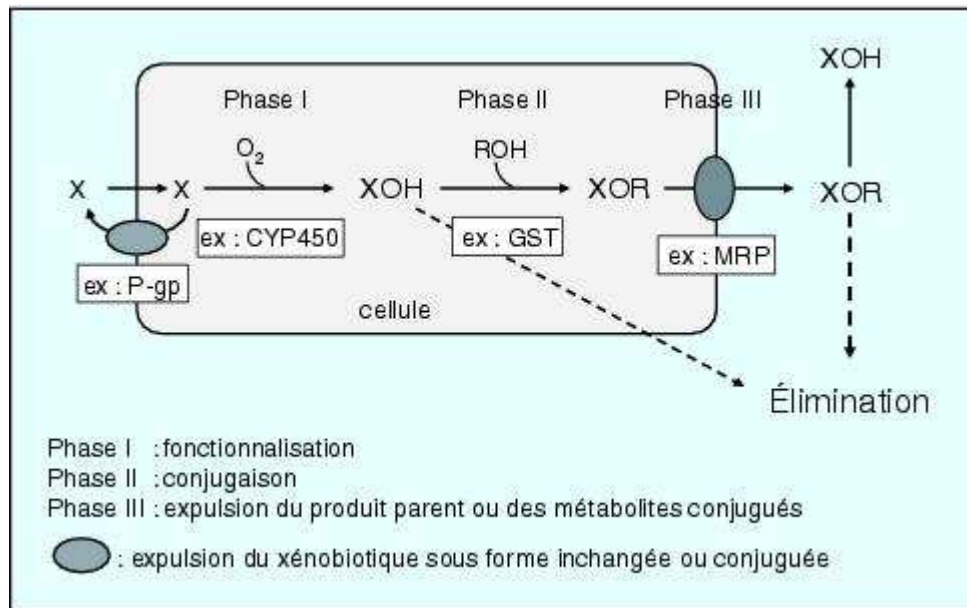


Figure 10 Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques. Les xénobiotiques (X) sont généralement des molécules hydrophobes, qui pénètrent facilement dans la cellule. Ils peuvent en être expulsés par des protéines comme la P-gp ou être métabolisés par fonctionnalisation (Phase I, exemple : les cytochromes P450 ou CYP 450) puis/ou par conjugaison (Phase II, exemple : les glutathion-transférases ou GST), en produits plus hydrophiles (XOH et XOR), ce qui facilite leur élimination hors de la cellule. L'élimination est directe ou effectuée par l'intermédiaire de protéines dites de Phase III, comme les MRP (*multidrug resistance proteins*) (d'après [43]).

3.1. La P-Glycoprotéine (P-gp), une pompe d'efflux :

Les transporteurs transmembranaires influencent le profil pharmacocinétique de nombreux médicaments. Parmi ces transporteurs, l'un des mieux connus et des plus importants d'un point de vue clinique est la glycoprotéine-P (Pgp). La Pgp appartient à la superfamille des transporteurs ABC et a été l'un des premiers transporteurs mis en évidence dans les phénomènes de résistance multidroque (MDR) des cellules cancéreuses [44].

La P-gp fonctionne comme pompe d'efflux dépendant de l'ATP. Elle est responsable de l'expulsion hors de la cellule de nombreuses molécules. En éliminant des substances endogènes et exogènes potentiellement toxiques, la Pgp protège ainsi l'organisme. Elle est exprimée principalement dans les organes et les tissus suivants : intestin, foie, barrière hématoencéphalique, placenta, rein, lymphocytes elle est codée par le gène ABCB1/MDR1 dont il existe plus de 50 polymorphismes. Une variabilité génétique de ce gène semble impliquée chez des patients non répondeurs à certains traitements ou, au contraire, présentant une toxicité accrue aux médicaments. A noter également que certaines tumeurs présentent une expression accrue de la P-gp, ce qui peut entraîner un échec thérapeutique lors de certaines chimiothérapies [44].

3.2. La Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) :

La BCRP appartient à la superfamille des transporteurs ABC et a été identifiée comme une des causes moléculaire impliquée dans les phénomènes de résistance multidrogue (MDR) des cellules cancéreuses. Elle fonctionne physiologiquement comme la P-gp en éliminant des substances endogènes et exogènes potentiellement toxiques pour l'organisme. Elle est sujette à une variabilité génétique et interagit avec de nombreux médicaments anticancéreux, d'où l'intérêt de prendre en compte son influence dans la prise en charge des malades atteints de cancer.

3.3. Polymorphisme génétique :

Comme pour toutes les protéines de l'organisme, la qualité et la quantité des enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation des médicaments dépendent majoritairement de l'information portée par le gène qui les code. Or, ces gènes peuvent présenter des anomalies de séquences (ou mutations), telles que des mutations ponctuelles ou SNP (*single nucleotide polymorphism*), des délétions partielles ou totales, ou encore des duplications ou amplifications de gènes. Ces différentes versions d'un même gène définissent des allèles et chaque individu possède deux versions alléliques d'un même gène, identiques ou différentes (l'une héritée de la mère, l'autre héritée du père), déterminant un génotype particulier. L'existence dans la population générale de ces différentes versions alléliques d'un même gène et, par conséquent, de différents génotypes, définit un polymorphisme génétique. Dans la définition classique du polymorphisme génétique s'ajoute une notion de fréquence arbitraire, précisant que l'allèle le moins fréquent présente une

fréquence au moins égale à 1 % [45]. Les mutations qui affectent les gènes des enzymes peuvent être responsables de variations d'expression et/ou d'activité de ces protéines, en entraînant une diminution, voire un déficit d'activité de l'enzyme, une augmentation de l'activité ou encore une absence totale de la protéine enzymatique [46].

Chapitre III : Pathologies cancéreuses et médicaments étudiés dans nos travaux personnels

1. Carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie) :

1.1. Epidémiologie

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) se développe habituellement sur une cirrhose (75 à 80% des cas), plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique, exceptionnellement sur un foie sain [47]. Le CHC est l'un des principaux cancers primitifs du foie. Il occupe le 8ème rang mondial des cancers primitifs du foie et le 5^{ème} rang en France. Sa prévalence est en augmentation, selon l'InVS et l'INCa le nombre annuel de nouveaux cas en France est passé de 1 800 en 1980 à 7 100 en 2008, 8 723 en 2012 et 9 628 en 2015, soit une incidence annuelle de 12,5/100 000 chez l'homme et de 2,8/100 000 chez la femme (rapport InVS 2015 www.invs.sante.fr) [48].

Cette croissance est principalement liée à l'épidémie d'infection par le virus de l'hépatite C, survenue dans les années 1960 à 1970, à la prise en charge des complications de la cirrhose, permettant d'obtenir une meilleure survie des patients cirrhotiques [49] et à une meilleure identification diagnostique.

Les principaux facteurs de risque de survenue d'un CHC sont la cirrhose, quelle que soit son origine, les virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite C (VHC), des

carcinogènes environnementaux ou chimiques, tels l'aflatoxine et l'arsenic, l'alcool, le tabac. Selon l'étiologie de la cirrhose, le risque de développer un CHC varie, avec une incidence annuelle de 2% (alcool), 5% (hémochromatose), à 3-8% (VHC) [50, 51]. Ce risque est plus faible en cas de cirrhose biliaire primitive, secondaire ou auto-immune. Il semble également moindre en cas de cirrhose secondaire à une stéato-hépatite non alcoolique. Le CHC peut également compliquer des maladies métaboliques telles le déficit en α 1-anti-trypsine, la tyrosinémie, la maladie de Wilson, les glycogénoses. De plus, le sexe masculin, l'âge (>55 ans), une coïnfection VHB-VHC ou la consommation d'alcool concomitante à une infection virale sont des facteurs de risque reconnus [52, 53].

1.2. Physiopathologie

Deux situations sont à distinguer : la présence ou l'absence d'une cirrhose.

En cas d'absence de cirrhose, les mécanismes carcinogéniques les mieux connus sont : au cours du VHB [54], l'intégration du génome viral dans celui de l'hépatocyte et l'expression de la protéine HBx sont responsables des altérations génétiques.

- l'induction de p53 muté par l'aflatoxine, flavonoïde de l'arachide, responsable d'un grand nombre de CHC sur foie sain en Afrique et en Asie [55]. Un effet oncogène du VHC a été suggéré mais reste débattu [56].

En présence d'une cirrhose, les mécanismes semblent relever de l'apparition d'altérations chromosomiques induites par les phénomènes de nécrose/régénération

hépatiques survenant au cours de la cirrhose. Des défaillances des mécanismes de réparation des erreurs de l'ADN semblent également être impliquées.

Le CHC se présente classiquement par l'apparition d'une douleur de l'hypochondre droit et d'une altération de l'état général. Il peut révéler la présence d'une cirrhose ou décompenser une cirrhose connue, en induisant la survenue d'une complication de celle-ci, telle l'apparition d'un ictère, d'une ascite ou d'une hémorragie digestive haute. Il faut noter que chez environ 25% des patients, la découverte du CHC est fortuite [57]. Ceci souligne l'importance du dépistage systématique.

Les malades doivent être suivis par échographie et/ou scanner ou IRM tous les 3 à 6 mois jusqu'à ce que le nodule disparaisse, augmente de taille ou remplisse les critères diagnostiques de CHC ; si le nodule augmente de taille et reste atypique, une nouvelle biopsie est recommandée (EASL-EORTC, 2012).

1.3. Éléments nécessaires à la stratégie thérapeutique

Contrairement aux autres tumeurs solides, pour lesquelles la décision thérapeutique est prise en fonction de la classification TNM, il n'y a pas de classification pronostique consensuelle pour le CHC (Olthoff, 2011). De nombreuses classifications ou scores ont été proposés (Okuda, BCLC [qui est plus un algorithme thérapeutique qu'un score pronostique], CLIP, GRETCH, TNM-AJCC...) mais les études les comparant ont donné des résultats discordants. Même si la classification BCLC (figure11) est souvent mise en avant dans les recommandations

internationales, elle comporte certaines imperfections en particulier en situation palliative où la classe C regroupe des malades et des tumeurs de pronostics différents.

Les indications thérapeutiques peuvent dépendre aussi de l'étiologie, il est essentiel de faire un bilan étiologique de l'hépatopathie.

En cas de fibrose sévère (cirrhose ou score Metavir F3), il convient d'évaluer la sévérité de l'hépatopathie : bilan clinique, biologique (TP, albuminémie, bilirubinémie, ALAT/ASAT), détermination du score de Child-Pugh, détermination du score MELD (Model for end-stage liver disease) si une transplantation est envisagée, et recherche de signes d'hypertension portale (endoscopie, écho-Doppler, numération plaquettaire). Lorsqu'une résection est envisagée, certains y ajoutent des tests « fonctionnels » (clairance du vert d'indocyanine) et/ou l'évaluation de l'hypertrophie du futur foie restant au décours d'une embolisation portale, et/ou, en l'absence de signes endoscopiques d'hypertension portale, une mesure de la pression portale par cathétérisme sus-hépatique.

Evaluation de l'atteinte hépatique : Score de Child-Pugh:

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie	Absente	Confusion	Coma
Ascite	Absente	Minime	Abondante
Bilirubinémie ($\mu\text{mol/L}$)	< 35	35 à 50	> 50
Albuminémie (g/L)	> 35	28 à 35	< 28
TP (%)	> 50	40 à 50	< 40

Score MELD

Score total	Classe
5 et 6	A
7 à 9	B
10 à 15	C

Adresse du site de la Mayo Clinic : <http://www.mayoclinic.org/meld/mayomodel6.html>

En pratique, en dehors des essais, la proposition thérapeutique doit être élaborée en RCP en fonction de l'extension tumorale, l'état du foie non tumoral et l'état général du patient.

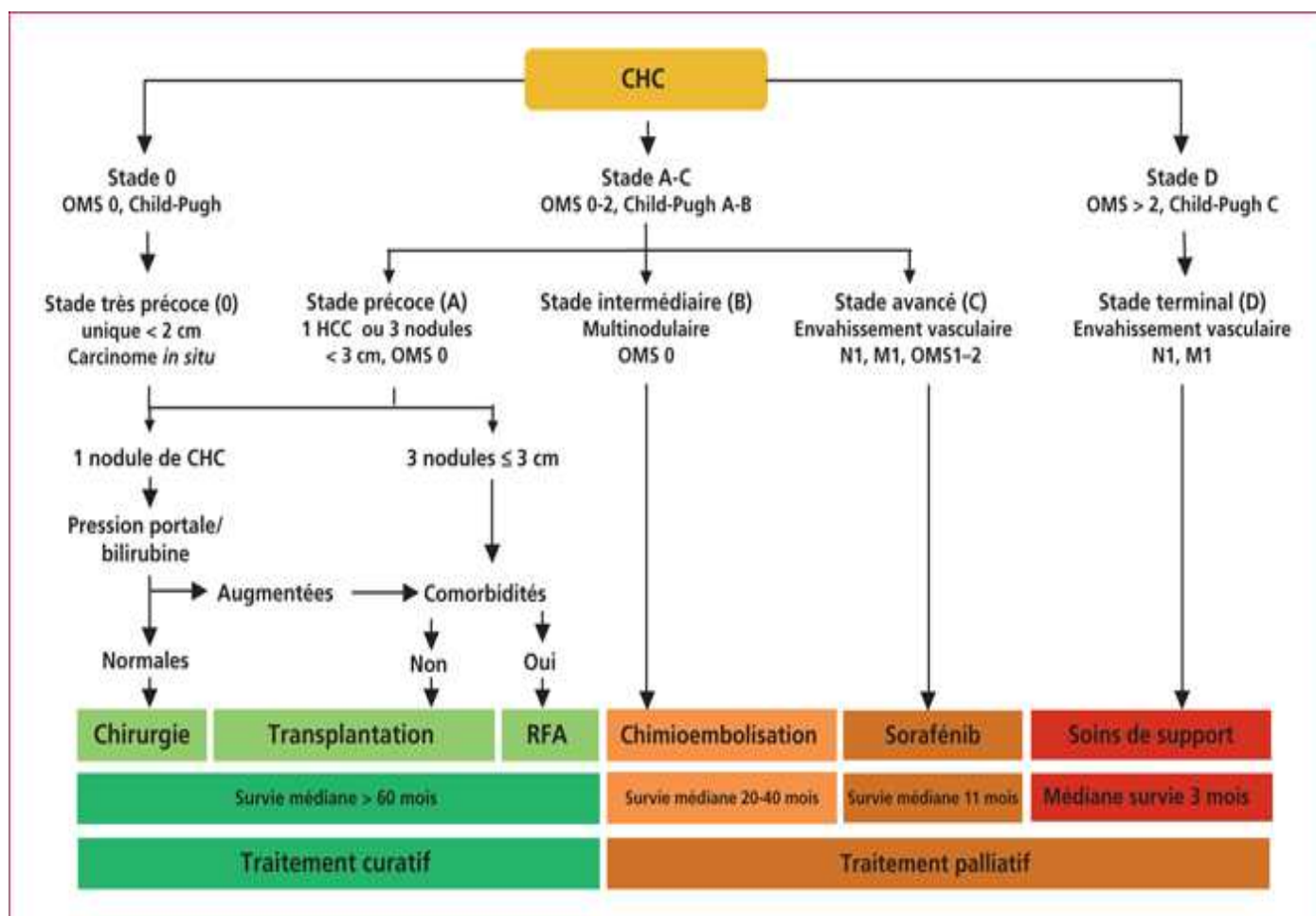


Figure 11 : La classification de CHC selon BCLC [58]

1.4. Traitements :

La transplantation (TH), la résection chirurgicale et les traitements percutanés représentent les traitements curatifs actuellement disponibles.

En pratique, en l'absence de consensus sur des critères, pour les patients ayant un CHC au-delà des critères de Milan et pas de contre-indication à la TH, il est conseillé d'en référer à un centre de TH et de discuter cette option en RCP de recours. La plupart des centres décident soit d'effectuer un traitement d'attente par chimio-embolisation artérielle, soit d'opter pour un « premier traitement curatif », résection ou destruction percutanée.

En résumé, la transplantation s'inscrit dans une stratégie globale de prise en charge du CHC. De ce fait, le choix de réaliser des traitements en attente de greffe et le type de traitements doivent être établis en collaboration avec le centre de transplantation. Les patients potentiellement éligibles à une transplantation doivent donc être discutés dès le diagnostic initial de CHC, avant tout traitement, afin de définir avec le centre la meilleure stratégie.

Il n'existe pas de chimiothérapie de référence pour le traitement du CHC évolué, ce type de traitement ne devant être prescrit que dans le cadre d'essais thérapeutiques. A la suite des essais, le sorafénib (Nexavar®) a bénéficié d'une extension d'AMM en octobre 2007 avec le libellé « indiqué dans le traitement du carcinome hépatocellulaire ». Considérant cette indication comme insuffisamment précise,

compte tenu des critères d'inclusion et des résultats de l'essai SHARP, un groupe de travail PRODIGE-AFEF a retenu comme indication du sorafénib (Nexavar®) :

« Traitement palliatif du CHC non éligible pour un traitement spécifique (TH, résection chirurgicale, destruction percutanée, CE), ou en récurrence après traitement spécifique, chez les malades en état général conservé (OMS 0 à 2) et Child-Pugh A »

1.4.1. Transplantation hépatique :

Quel que soit le stade et chez des patients n'ayant pas de contre-indications opératoires évidentes, elle doit être évoquée.

A l'évidence, cette thérapie donne les meilleurs résultats en termes de survie à long terme si certains critères sont respectés. Le point capital est qu'au moment de la transplantation la masse tumorale soit limitée et qu'il n'existe pas d'extension tumorale [59].

1.4.2. Résection chirurgicale :

Après la transplantation hépatique, c'est la meilleure option. Elle nécessite une fonction hépatique conservée (score Child-Pugh A) et que l'hypertension portale ne soit pas trop importante. Cette dernière est estimée au mieux par la mesure du gradient porto-sus-hépatique par cathétérisme de la veine hépatique. La taille, voire le nombre de tumeurs ne sont pas de réels obstacles.

1.4.3. Méthodes ablatives transcutanées :

Elles concernent la résection pour les tumeurs en faible nombre (moins de 3) de petites tailles (moins de 3 cm) et surtout s'il existe une hypertension portale notable ou que la fonction hépatique soit limitée (score Child-Pugh B). Elles requièrent l'absence d'ascite.

1.4.4. Approches endoartérielles

En cas d'impossibilité de traitement ablatif (résection ou approche percutanée), la chimio-embolisation artérielle du carcinome hépatocellulaire ou la radio-embolisation sont les thérapies les plus répandues.

1.4.5. chimio-embolisation

Le principe du traitement par chimio-embolisation est fondé sur la nature essentiellement artérielle de la vascularisation tumorale du carcinome hépatocellulaire. Elle consiste en l'association d'une chimiothérapie intra-artérielle (doxorubicine) et d'une embolisation artérielle, le plus souvent par gélatine résorbable ou par microparticules.

1.4.6. Radio-embolisation

Cette nouvelle méthode de traitement consiste en l'injection intra-artérielle hépatique de microsphères porteuses d'Yttrium 90, émettrices de rayonnement bêta, associant

donc une radiothérapie « interne » et une micro-embolisation. L'intérêt de cette méthode est qu'il n'est pas nécessaire d'isoler le patient en chambre plombée.

1.4.7. Radiothérapie externe

Pendant longtemps, l'irradiation hépatique était considérée comme dangereuse et inefficace dans le traitement du carcinome hépatocellulaire. En effet, la dose maximale pour le foie entier était de 35 Gy par fraction de 2 Gy, ce qui permettait de diminuer le risque d'hépatopathie radio-induite. Le progrès de la radiothérapie conformationnelle, puis stéréotaxique, en font une thérapie souvent pratiquée, notamment en Asie [59].

1.4.8. Sorafénib (Nexavar®)

Le sorafénib est le premier traitement systémique qui ait induit un allongement significatif de la survie globale (médiane de 10,7 mois contre 7,9 mois) et de la survie sans progression (5,5 mois contre 2,8 mois) chez les malades traités [42]. Il était le seul traitement systémique avant les résultats de l'essai RESORCE, qui a démontré la preuve de l'intérêt du regorafenib en 2ème ligne après échec du sorafénib dans le traitement des CHC avancés.

1.4.9.Régorafénib (STIVARGA®)

Le régorafénib a récemment démontré l'intérêt de son utilisation en deuxième ligne après l'échec du sorafénib dans le traitement des patients adultes atteints de CHC.

2. Médicaments du traitement du CHC utilisés dans nos travaux :

2.1. Sorafénib (NEXAVAR ®): [60]

Le sorafénib est un inhibiteur multikinase qui diminue la prolifération des cellules tumorales *in vitro*. Le sorafénib inhibe la croissance tumorale d'un large spectre de xénogreffes tumorales humaines chez la souris athymique, accompagné d'une diminution de l'angiogenèse tumorale.

2.1.1. Indications

Le sorafénib est indiqué dans le traitement du carcinome hépatocellulaire, dans le traitement du carcinome rénal avancé après échec d'un traitement préalable à base d'interféron alfa ou d'interleukine 2 ou chez des patients pour lesquels ces traitements sont considérés comme inadaptés et dans le traitement du carcinome thyroïdien progressif, localement avancé ou métastatique, différencié, réfractaire à l'iode radioactif.

2.1.2. Pharmacocinétique :

Après administration orale, le pic de concentration plasmatique du sorafénib est atteint en environ 3 heures. Après un repas riche en graisses, l'absorption du sorafénib est réduite de 30 % par rapport à une administration à jeun. Au-delà de 400 mg administrés deux fois par jour, les Cmax et AUC moyennes du sorafénib

n'augmentent pas proportionnellement à la dose. *In vitro*, la liaison aux protéines plasmatiques humaines du sorafénib est de 99,5 %.

Une administration répétée de sorafénib pendant 7 jours a entraîné une accumulation 2,5 à 7 fois plus importante de ce dernier que celle observée lors d'une administration unique. Les concentrations plasmatiques du sorafénib à l'équilibre sont atteintes en 7 jours, avec un rapport des concentrations moyennes maximales (pic) et minimales (vallée) inférieur à 2.

La demi-vie d'élimination du sorafénib est d'environ 25 à 48 heures. Le sorafénib est principalement métabolisé dans le foie par un métabolisme oxydatif médié par le CYP3A4, ainsi qu'une glucuroconjugaison assurée par l'UGT1A9.

Les formes conjuguées du sorafénib peuvent être scindées au niveau du tractus gastro-intestinal par des bactéries à activité glucuronidase permettant la réabsorption des formes non conjuguées du principe actif. L'administration concomitante de néomycine a montré une interférence avec ce mécanisme, diminuant ainsi la biodisponibilité moyenne du sorafénib de 54 %.

Le principal métabolite circulant du sorafénib dans le plasma, le pyridine N-oxyde, montre une activité *in vitro* comparable à celle du sorafénib et constitue environ 9-16 % des analytes circulants à l'équilibre.

2.1.3. Interactions :

L'administration des inducteurs enzymatiques comme la rifampicine pendant 5 jours précédant l'administration d'une dose unique de sorafénib a induit une réduction moyenne de 37 % de l'AUC du sorafénib. D'autres inducteurs du CYP3A4 et/ou de la glucuroconjugaison peuvent également augmenter le métabolisme du sorafénib et ainsi diminuer ses concentrations.

Selon les données vidal 2017 les interactions pharmacocinétiques cliniques entre le sorafénib et les inhibiteurs du CYP3A4 sont improbables.

Le sorafénib inhibe *in vitro* les CYP2B6, CYP2C8 et CYP2C9 de façon équivalente. Le sorafénib administré à la dose recommandée de 400 mg deux fois par jour pourrait ne pas être un inhibiteur *in vivo* du CYP2B6 ou du CYP2C8. En outre, un traitement concomitant par le sorafénib et la warfarine, substrat du CYP2C9, n'a pas entraîné de modification des valeurs moyennes de l'INR et du taux de prothrombine par rapport au traitement placebo. Ainsi, on peut donc considérer que le risque d'inhibition du CYP2C9 par le sorafénib est faible. Cependant, il convient de surveiller régulièrement l'INR des patients traités par la warfarine ou la phenprocoumone.

Le sorafénib n'est ni un inhibiteur ni un inducteur de ces isoenzymes *CYP3A4*, *CYP2D6* et *CYP2C19* du cytochrome P450. Ainsi les interactions

pharmacocinétiques cliniques du sorafénib avec les substrats de ces enzymes sont improbables.

Selon les données vidal 2017 le sorafénib inhibe *in vitro* la protéine de transport p-glycoprotéine (P-gp). Une augmentation des concentrations plasmatiques des substrats de la P-gp tels que la digoxine ne peut être exclue lors d'un traitement concomitant avec le sorafénib.

Le sorafénib n'a eu aucun effet cliniquement significatif sur la pharmacocinétique d'autres agents anticancéreux comme la gemcitabine, le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatine ou le cyclophosphamide.

2.2. Doxorubicine : [60]

La doxorubicine est un agent antinéoplasique et immunomodulateur qui se fixe rapidement sur les structures nucléaires de la cellule, bloquant la synthèse de l'A.D.N. et de l'A.R.N. La doxorubicine est un substrat de la P-gp.

2.2.1. Indications :

La doxorubicine est indiqué dans le traitement des carcinomes du sein, des sarcomes des os et des parties molles, et de la maladie de Hodgkin, des lymphomes non hodgkiniens, des tumeurs solides de l'enfant, des cancers du poumon, des

leucémies aiguës et chroniques, des cancers de la vessie, de l'ovaire et de l'estomac.

2.2.2. Pharmacocinétique :

Après administration par voie intraveineuse, la doxorubicine quitte rapidement le plasma sanguin pour se fixer sur les tissus sous forme active, non métabolisée. La courbe d'élimination plasmatique du produit est triphasique avec une phase initiale rapide, d'une demi-vie d'environ 5 minutes et une phase terminale lente, d'une demi-vie d'environ 36 heures.

La doxorubicine est éliminée essentiellement par l'excrétion biliaire sous forme de produit inchangé et de métabolites (40 à 50 % de la dose en 7 jours).

L'excrétion urinaire est négligeable (environ 10 % de la dose, principalement sous forme de produit inchangé).

Compte-tenu de l'élimination hépato-biliaire de la doxorubicine, toute modification de la fonction hépatique peut entraîner une augmentation des taux plasmatiques du produit avec une demi-vie très allongée en cas d'insuffisance hépatique sévère et un risque de toxicité.

2.2.3. Interactions :

La doxorubicine est surtout utilisée en association avec d'autres cytotoxiques. Une toxicité additive peut survenir notamment avec des effets

médullaires/hématologiques et gastro-intestinaux. L'utilisation de la doxorubicine dans des chimiothérapies associant d'autres produits potentiellement cardiotoxiques (par ex : cyclophosphamide), de même que l'utilisation concomitante d'autres produits à visée cardiaque (par ex., inhibiteurs calciques) requièrent une surveillance de la fonction cardiaque tout-au-long du traitement.

Les modifications de la fonction hépatique induites par des traitements concomitants peuvent affecter le métabolisme, la pharmacocinétique, l'efficacité et/ou la toxicité de la doxorubicine.

Un risque de majoration de la toxicité de la doxorubicine par majoration de ses concentrations plasmatiques est possible en cas d'association au sorafénib ou à la verapamil.

La grande variation de la coagulabilité et l'augmentation des risques thrombotique et hémorragique au cours des affections tumorales, auxquelles s'ajoutent l'éventualité d'une interaction entre les AVK (antivitamine K) et la chimiothérapie anticancéreuse, imposent, s'il est décidé de traiter le patient par AVK, d'augmenter la fréquence des contrôles de l'INR (International Normalized Ratio).

3. Cancer colorectal :

3.1. Epidémiologie :

Le cancer colorectal (CCR) représente, par sa fréquence, le 3^{ème} cancer chez l'homme et le 2^{ème} chez la femme. Avec 43 000 nouveaux cas par an (en 2015), dont 54 % chez l'homme, le CCR est le 2^{ème} cancer le plus fréquent en France, soit une incidence annuelle de 37/100 000 chez l'homme et de 23.6/100 000 chez la femme (rapport InVS 2015 www.invs.sante.fr) [48]. Il entraîne près de 17 000 décès par an, même si sa mortalité est passée sous la barre des 50 %. L'âge moyen de diagnostic est de 70 ans. Le risque de CCR est multiplié par 2 à 3 chez les sujets apparentés au 1er degré à des sujets atteints d'un CCR et d'un adénome supérieur à 1 cm. Le risque est multiplié par 3 si le parent atteint a moins de 60 ans, et par 4 quel que soit l'âge si deux parents sont atteints. Une minorité de CCR (moins de 10 %) se déclarent dans un contexte de maladie à transmission héréditaire autosomique dominante : polypose adénomateuse familiale ou CCR héréditaire sans polypose (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer - HNPCC, ou syndrome de Lynch). Les maladies inflammatoires digestives (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) augmentent le risque [60].

3.2. Physiopathologie :

Le CCR est dans 95 % des cas un adénocarcinome. 60 à 80 % des CCR se développent à partir d'un polype adénomateux. Plusieurs études suggèrent un lien

entre le risque d'apparition d'un CCR et un apport calorique élevé. Le rôle protecteur des légumes semble possible [60].

3.3. Traitements :

Les modalités de la prise en charge doivent être définies sur la base des conclusions d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) réunissant un chirurgien viscéral, un oncologue et un radiothérapeute.

Une vérification des critères d'opérabilité et de résécabilité est nécessaire avant toute prise de décision de traiter.

3.3.1. Chirurgie :

La qualité de l'exérèse chirurgicale est le facteur essentiel du pronostic du cancer du rectum.

Les modalités de la résection rectale varient en fonction du siège de la tumeur, de son extension éventuelle aux organes de voisinage, du terrain du patient, de son souhait de conservation et de l'état du sphincter anal

3.3.2. Radiothérapie adjuvante (après chirurgie)

Indiquée uniquement si elle n'a pas été réalisée en préopératoire dans les stades III et au cas par cas dans les stades IV, elle diminue le risque de récurrence locale, mais ne modifie pas la survie à long terme.

3.3.3. Chimiothérapie palliative :

Le choix entre différents schémas (5FU seul ou associé à l'irinotécan, plus ou moins bévacizumab ou cétuximab), est à discuter en fonction des toxicités et des contre-indications. En cas de métastases hépatiques, une chimiothérapie intra-artérielle hépatique par 5FU ou oxaliplatine peut être discutée.

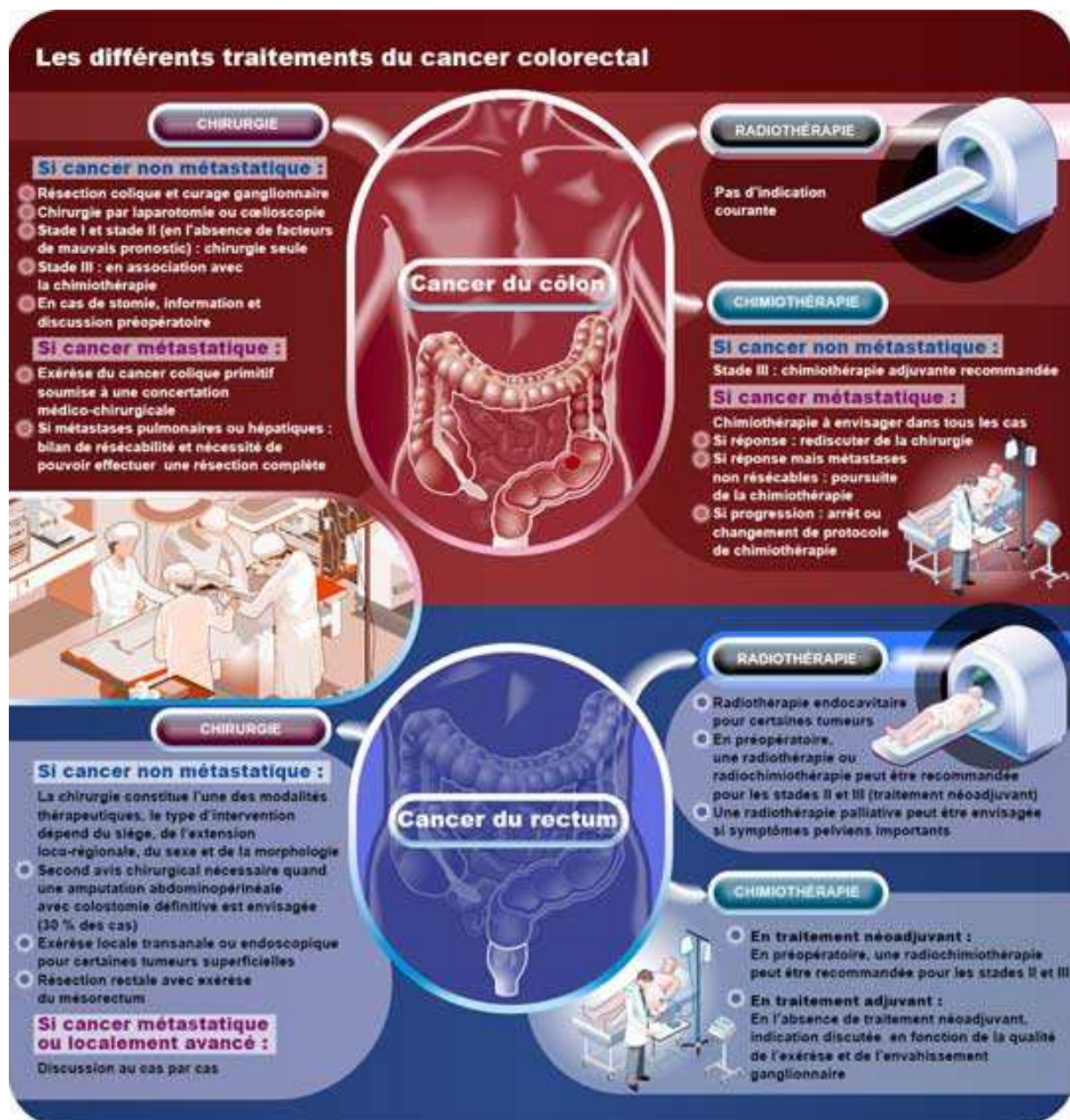


Figure 12 : Les différents traitements du cancer colorectal

3.4. Cancer colorectal métastatique :

Le cancer colorectal métastatique (CCRm) correspond au stade IV de la classification UICC, où le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, vers des emplacements ou des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons

Le traitement du CCRm est généralement d'ordre palliatif, c'est-à-dire qu'il vise à atténuer les symptômes, mais ne peut pas éradiquer la maladie. Les traitements palliatifs comme la chimiothérapie et les thérapies biologiques peuvent aider à contrôler le cancer, améliorer la qualité de vie et aider les patients à vivre plus longtemps.

Chez certaines personnes, lorsque le cancer n'atteint que le foie ou les poumons, le traitement permet de garder le cancer sous contrôle pendant une longue période voire de l'éradiquer.

Pour augmenter les chances de survie des patients, il est nécessaire d'adopter un plan de traitement personnalisé en fonction des besoins de chacun.

3.4.1. Traitement :

La résection chirurgicale doit toujours être discutée et éventuellement rediscutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) comprenant au moins un chirurgien et un radiologue expérimenté en pathologie hépatique. La discussion repose sur le rapport risque/bénéfice de la chirurgie.

3.4.1.1. Recommandations :

Chez les patients avec des métastases pouvant devenir résécables en cas de réponse majeure, il est recommandé de privilégier, après discussion en RCP, un protocole qui peut donner un taux de réponse élevé (réponses objectives RECIST1.1) dans l'optique d'une résécabilité secondaire [61] : tri-chimiothérapie ou bi-chimiothérapie plus biothérapie. Deux essais de phase III ayant inclus des patients non sélectionnés sur la résécabilité secondaire ont obtenu des taux de réponse objective RECIST plus élevés avec une bi-chimiothérapie associée au cétuximab qu'avec une bi-chimiothérapie associée au bévacizumab, en l'absence de mutation RAS [62,63].

Deux essais de phase II randomisés ont obtenu des taux de réponses proches de 80 % et des taux de résection secondaire de 25 % avec une bi-chimiothérapie associée au cétuximab [64] et de 50 % avec une tri-chimiothérapie associée au bévacizumab [65].

3.4.1.2. Choix de la chimiothérapie :

La question principale est celle de l'utilisation d'emblée d'une polychimiothérapie (bithérapie +/- biothérapie) ou d'une monothérapie (LV5FU2 ou capecitabine +/- biothérapie) avec intensification en cas de progression.

Quatre essais de phase III, dont l'essai FFCD 2000-05, ont comparé ces stratégies (sans biothérapie) et ont montré chez ces patients non résécables des résultats

superposables avec des médianes de survie dans les 2 groupes de l'ordre de 16 mois, liées à l'inclusion de patients souvent âgés, polymétastatiques et à l'état général altéré [66, 67, 68, 69]. En outre, l'essai FFCD 2001-02 chez les patients de plus de 75 ans ne montre pas d'avantage à prescrire une bithérapie (Folfiri) en première ligne par rapport à une monothérapie (LV5FU2) [70].

3.4.1.3. Utilisation de biothérapies :

Il est possible d'administrer une double dose de cétuximab (500 mg/m²) toutes les deux semaines car sa pharmacocinétique est identique à celle de l'administration de 250 mg / m² hebdomadaire [71, 72, 73, 74] (recommandation : grade C)

Il est possible de faire les perfusions de bévacizumab en 10 minutes que la dose soit de 5 mg/kg toutes les 2 semaines ou de 7,5 mg/kg toutes les 3 semaines [75, 76,77] (accord d'experts).

Stratégie CCRM RAS WT (KRAS et NRAS exon 2, 3 et 4) et grades (Gr) de recommandation				
D'emblée résécables	Potentiellement résécables	Jamais Résécables Symptomatiques Volume tumoral menaçant	Jamais Résécables Asymptomatiques Volume tumoral non menaçant	Jamais Résécables Comorbidité-Agés OMS 2
L1 Folfox Périop (Gr B) Option: - chir d'emblée (Avis Expert)	Folfox / Folfiri +/- cetux ou Pani (Gr B) Folfoxiri +/- beva (Gr B) Folfox / Folfiri +/- beva (Gr C) Si pas de résection envisageable après 8 à 12 cures et si pas de progression : Discuter entretien par 5FU/capecitabine (Gr B) +/- beva (Gr B) Ou pause (si réponse majeure) (Gr C)	Folfox / Folfiri +/- cetux ou Pani (Gr B) Folfox / folfiri +/- beva (Gr B) Folfoxiri +/- Beva (Gr B)	5FU+/-beva (Gr A) (Jusqu'à Progression et évaluation Tous les 2 mois)	5FU +/- beva (Gr A) Folfox / Folfiri +/- cetux ou Pani ou beva (dose CT adaptée) (Gr B)
L2	Si pas de biothérapie L1 : Switch CT +/- beva ou afli (si folfox L1) ou cetux ou Pani (seult av folfiri) (Gr B) Si beva L1 : Switch CT +/- beva (Gr A) ou afli (Gr A si folfox L1)) ou cetux ou pani (seul' av folfiri) (Gr B) Si anti-EGFR L1 : Switch CT +/- beva ou afli (si folfox L1) (Gr B) Si triCT +/- beva L1 : rego (OMS 0-1) (Gr A) ou TAS-102 (Gr B) (ATU en cours) Switch CT : Folfox ↔ Folfiri LV5FU2 ↔ Folfiri ou Folfox			
L>3	Rego si OMS 0-1 (Gr A) TAS-102 (Gr B) (ATU en cours) Cetux ou Pani +/- Irinotecan (si pas anti EGFR L1 ou L2) (Gr B) Option : Réintroduction antiEGFRs (Gr C) BSC (si OMS > 2)			

Figure 13. Stratégie thérapeutique médicale dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques [61].

4. Médicaments du traitement du CCR utilisés dans nos travaux :

4.1. Bévacizumab (AVASTIN®): [60]

4.1.1. Indication :

Le bévacizumab est indiqué en association à une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, chez les patients adultes atteints de cancer colorectal métastatique. Il est indiqué en traitement de première ligne en association au paclitaxel, chez des patients adultes atteints de cancer du sein métastatique, en association à une chimiothérapie à base de sels de platine ou à l'erlotinib chez les patients adultes atteints de cancer bronchique non à petites cellules, avancé et non opérable, métastatique ou en rechute. Il est également indiqué en association au carboplatine et à la gemcitabine ou au carboplatine et au paclitaxel ou au topotécan ou à la doxorubicine liposomale pégylée chez les patientes adultes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif, en première récurrence, sensible aux sels de platine et qui n'ont pas été préalablement traitées par du bévacizumab.

4.1.2. Pharmacocinétique :

Les données pharmacocinétiques disponibles pour le bévacizumab proviennent de dix études cliniques réalisées chez des patients atteints de tumeurs solides. Dans toutes les études cliniques, le bévacizumab était administré par perfusion I.V. La

vitesse de perfusion était ajustée en fonction de la tolérance, la durée de la perfusion initiale étant de 90 minutes. La pharmacocinétique du bévacizumab était linéaire aux doses allant de 1 à 10 mg/kg.

L'évaluation du métabolisme du bévacizumab chez le lapin après administration I.V. unique de bévacizumab indiquait que le profil métabolique était similaire à celui attendu pour une molécule d'IgG native ne se liant pas au VEGF. Le métabolisme et l'élimination du bévacizumab sont similaires à ceux de l'IgG endogène, principalement via un catabolisme protéolytique dans l'ensemble du corps, y compris les cellules endothéliales, et ne sont pas intrinsèquement liés à une élimination rénale et hépatique.

La valeur de la clairance des patients est en moyenne égale à 0,188 L/jour chez la femme et à 0,220 L/jour chez l'homme. Après correction selon le poids corporel, la clairance du bévacizumab était plus importante (+ 17 %) chez les hommes que chez les femmes. Selon un modèle à deux compartiments, la demi-vie d'élimination de référence est de 18 jours pour une femme et de 20 jours pour un homme.

4.1.3. Interactions :

Les résultats d'analyses de pharmacocinétique de population n'ont montré aucune interaction cliniquement significative lors de la co-administration de chimiothérapies avec le bévacizumab. Il n'y avait de différence ni statistiquement significative ni cliniquement pertinente de la clairance du bévacizumab chez les patients recevant bévacizumab en monothérapie comparé à ceux recevant bévacizumab en association à l'interféron alfa-2a, l'erlotinib ou à d'autres chimiothérapies (IFL, 5-

FU/LV, carboplatine-paclitaxel, capécitabine, doxorubicine ou cisplatine/gemcitabine).

Aucune interaction cliniquement pertinente du bévacizumab n'a également été observée sur la pharmacocinétique de l'interféron alfa-2a, de l'erlotinib (et son métabolite actif OSI-420) ou d'autres chimiothérapies : irinotécan (et son métabolite actif SN38), capécitabine, oxaliplatine (déterminée d'après la mesure du platine libre et total) ou cisplatine, lors de leur co-administration. Les conclusions sur l'impact du bévacizumab sur la pharmacocinétique de la gemcitabine ne peuvent être tirées.

4.2. Irinotécan (CAMPTO®) : [60]

L'irinotécan est un dérivé hémisynthétique de la camptothécine. Il s'agit d'un agent antinéoplasique qui agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase I.

L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase dans la plupart des tissus en un métabolite actif, le SN-38, qui s'est révélé plus actif que l'irinotécan sur la topo-isomérase I purifiée et plus cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules tumorales murines ou humaines. L'inhibition de l'ADN topo-isomérase I par l'irinotécan ou le SN-38 induit des lésions simple-brin de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication de ce dernier et sont responsables de l'activité cytotoxique. Celle-ci est fonction du temps du contact avec les cellules et est spécifique de la phase S.

4.2.1. Indications :

L'irinotécan est indiqué dans le traitement des cancers colorectaux avancés :

- en association avec le 5-fluorouracile (5-FU) et l'acide folinique (AF) chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie antérieure au stade avancé de leur maladie.
- en monothérapie après échec d'un traitement ayant comporté du 5-FU.

L'irinotécan est indiqué en association avec le cétuximab dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec gène KRAS de type sauvage exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).

L'irinotécan est indiqué en association avec le 5-fluorouracile, l'acide folinique et le bévacizumab ou avec la capécitabine avec ou sans bévacizumab dans le traitement de première ligne chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique.

4.2.2. Pharmacocinétique :

Au cours d'un essai de phase I chez 60 patients traités selon le schéma d'administration recommandé (perfusion intraveineuse de 30 minutes à raison de 100 à 750 mg/m² toutes les trois semaines), l'irinotécan a montré un profil d'élimination biphasique ou triphasique.

La clairance plasmatique moyenne est de 15 l/h/m² et le volume de distribution à l'état d'équilibre (Vss) de 157 l/m². La demi-vie plasmatique moyenne de la première phase du modèle triphasique est de 12 minutes, celle de la seconde phase de 2,5 heures et la demi-vie terminale de 14,2 heures.

Le SN-38 a montré un profil d'élimination biphasique avec une demi-vie d'élimination terminale moyenne de 13,8 heures.

Une large variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques est observée principalement pour le métabolite SN-38.

Toutes les études ont montré que l'exposition à l'irinotécan et au SN-38 augmente proportionnellement avec la dose administrée de l'irinotécan ; la pharmacocinétique est indépendante du nombre de cycles administrés et du schéma d'administration.

In vitro, la liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 65 % pour l'irinotécan et de 95 % pour le SN-38.

L'équilibre de masse et les études de métabolisme avec le carbone 14 ont montré que plus de 50 % de la dose d'irinotécan administrée par voie intraveineuse est excrétée sous forme inchangée, dont 33 % principalement dans les fèces via la bile et 22 % dans les urines.

L'irinotécan inchangé est l'entité principale dans le plasma, suivi par l'APC, le SN-38 glycuconjugué et le SN-38. Seul le SN-38 possède une activité cytotoxique significative.

La clairance d'irinotécan est diminuée d'environ 40 % chez les patients ayant une bilirubinémie comprise entre 1,5 et 3 fois la LSN. Chez ces patients, la posologie de 200 mg/m² d'irinotécan entraîne une exposition plasmatique comparable à celle observée chez les patients dont les paramètres hépatiques sont normaux et qui reçoivent la posologie de 350 mg/m².

4.2.3. Interactions :

Plusieurs études ont montré que l'administration concomitante d'anticonvulsivants inducteurs du cytochrome CYP450 3A4 (comme la carbamazépine, le phénobarbital ou la phénytoïne) entraînait une diminution de l'exposition à l'irinotécan, au SN-38 ainsi qu'au SN-38 glucuronidé et réduisait leurs effets pharmacodynamiques. Les effets de ces anticonvulsivants se traduisent par une diminution de 50 % ou plus des aires sous la courbe (AUC) du SN-38 et du SN-38 glucuronidé. En plus de l'induction des enzymes du cytochrome CYP450 3A4, l'augmentation de la glucuronidation et de l'excrétion biliaire peut jouer un rôle sur la réduction de l'exposition à l'irinotécan et à ses métabolites.

Une attention particulière est requise chez les patients recevant de façon simultanée des médicaments connus pour inhiber (comme le kétoconazole) ou induire (comme la rifampicine, la carbamazépine, le phénobarbital ou la phénytoïne) le métabolisme du cytochrome CYP450 3A4. L'administration concomitante d'irinotécan avec un inducteur ou inhibiteur de cette voie métabolique peut altérer le métabolisme de l'irinotécan et doit être évitée.

PARTIE II : TRAVAUX **PERSONNELS**

Article 1: *Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of Pglycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study.* Publié dans Cancer Chemotherapy Pharmacology. 2017 Apr;79(4):759-766.

Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le sixième cancer dans le monde en terme de prévalence et le plus fréquent des cancers primitifs du foie. C'est la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde [78]. Il survient presque toujours sur une maladie hépatique préexistante, principalement la cirrhose (90% des cas); rarement dans la stéatose et exceptionnellement sur un foie sain [79, 80]. Le risque est plus élevé dans le cadre d'une cirrhose survenant après une hépatite C, une hépatite B ou une hémochromatose. Il est plus faible dans la cirrhose liée à l'alcoolisme [80, 81, 82]. Lorsque le CHC est diagnostiqué tôt, le traitement peut être curatif (résection chirurgicale, destruction percutanée, transplantation hépatique). Cependant, 50 à 70% des cancers sont diagnostiqués tardivement. Dans ces situations, seuls des traitements palliatifs régionaux ou systémiques sont possibles. Aucun traitement palliatif n'a été efficace jusqu'à l'avènement des thérapies ciblées en 2007. Ces traitements combinés aux progrès technologiques en radiologie interventionnelle et radiothérapie ont ouvert de nouvelles perspectives [83]. Le sorafénib a été le premier médicament qui a donné des résultats positifs dans l'essai SHARP [84].

Le sorafénib comme d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) est un inhibiteur oral multi-cible (CRAF, BRAF, V600E BRAF, FLT3 et C-KIT); Il inhibe également la vascularisation tumorale (CRAF, VEGF-R1, R2 et R3, PDGFR b), en plus de ses effets antiprolifératifs.

Il est indiqué dans le traitement du CHC, du carcinome rénal avancé après un échec d'un traitement antérieur à base d'interféron alfa ou d'interleukine-2 ou chez des

patients pour lesquels ces thérapies sont considérées comme inadaptées [84, 85, 86] et dans le traitement du carcinome thyroïdien progressif, localement avancé ou métastatique, différencié.

La biodisponibilité orale moyenne du sorafénib est d'environ 22% [86]. Après administration orale, le pic de concentration plasmatique est atteint environ 3 heures après, et les concentrations plasmatiques du sorafénib à l'équilibre sont atteintes après 7 jours d'administrations répétées.

Des études *in vitro* ont montré que le sorafénib était modérément transporté par la P-glycoprotéine (P-gp) et plus efficacement par la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) [87], ce qui pourrait réduire son absorption intestinale. Il est fortement lié aux protéines plasmatiques (99,5%) et est métabolisé par deux voies: le métabolisme oxydatif médié par le cytochrome P450 (CYP450) et la glucuronoconjugaison assurée par l'uridine diphosphate glucuronyl transférase (UGT1A9). Les formes conjuguées du sorafénib peuvent être hydrolysées au niveau du tractus gastro-intestinal par des bactéries à activité glucuronidase permettant la réabsorption des formes non conjuguées du principe actif. Le principal métabolite circulant dans le plasma (9-16%) est la N-oxyde pyridine qui possède *in vitro*, une activité comparable à celle du sorafénib. Après 14 jours, 96% de la dose administrée sont éliminés, 77% dans les selles et 19% dans l'urine sous forme de métabolites glucuronidés.

L'existence d'une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques du sorafénib rend son suivi thérapeutique pharmacologique important [88, 89].

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'influence du polymorphisme génétique de la P-gp (ABCB1) et de la BCRP (ABCG2) sur la pharmacocinétique du sorafénib dans le cadre d'un suivi thérapeutique pharmacologique chez des patients traités pour un CHC avancé.

Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study

Mahamadou Tandia, Asma Mhiri, Bernard Paule, Raphaël Saffroy, Valérie Cailliez, et al.

Cancer Chemotherapy and Pharmacology

ISSN 0344-5704

Cancer Chemother Pharmacol
DOI 10.1007/s00280-017-3268-y



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study

Mahamadou Tandia^{1,2} · Asma Mhiri¹ · Bernard Paule³ · Raphaël Saffroy⁴ · Valérie Cailliez⁵ · Gaëlle Noé¹ · Robert Farinotti² · Laurence Bonhomme-Faivre^{1,2}

Received: 4 November 2016 / Accepted: 24 February 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract

Objectives We studied the relation between the polymorphism of P-glycoprotein (P-gp) and of breast cancer resistance protein (BCRP), encoded by ABCB1 and ABCG2 genes, respectively, and the pharmacokinetic variability and clinical response during the treatment with sorafenib of hepatocellular carcinoma.

Methods At the Paul Brousse Hospital in Villejuif, France, 47 consecutive patients with advanced HCC treated with a single agent sorafenib, were enrolled. Sorafenib exposure was measured by its plasma concentration 3 h after oral administration of 400 mg (bid) by liquid chromatography. All enrolled patients were genotyped for ABCB1 (rs2032582; rs1045642) and ABCG2 (rs2231137; rs2231142; rs2622604) by blood genomic DNA extraction and Mass ARRAY genotyping. The clinical response was evaluated after 3 months of treatment according to the RECIST criteria.

Key findings Significant associations between sorafenib exposure and the studied polymorphisms were observed for

ABCB1 3435C>T, ABCG2 34G>A, ABCG2 1143C>T and ABCG2 421C>A, but not for ABCB1 2677G>TA SNP. In heterozygous patients for ABCB1 3435 C>T, ABCG2 34 G>A and ABCG2 1143 C>T polymorphisms were significantly associated with the lowest sorafenib plasma levels. Those patients presented a tendency to have the best clinical evolution.

Conclusion Heterozygous forms of the studied polymorphisms could be associated with a better therapeutic response.

Keywords P-glycoprotein (ABCB1) · Breast cancer resistance protein (ABCG2) · Sorafenib · Drug monitoring · Hepatocellular carcinoma (HCC) · Single nucleotide polymorphism (SNP)

Abbreviations

P-gp	P-glycoprotein
BCRP	Breast cancer resistance protein

✉ Mahamadou Tandia
mahamadou.tandia@pbr.aphp.fr

Asma Mhiri
mhiri_asma@hotmail.com

Bernard Paule
bepaule@wanadoo.fr

Raphaël Saffroy
raphael.saffroy@aphp.fr

Valérie Cailliez
valerie.cailliez@aphp.fr

Gaëlle Noé
noe.gaelle@gmail.com

Robert Farinotti
robert.farinotti@aphp.fr

Laurence Bonhomme-Faivre
laurence.bonhomme-faivre@aphp.fr

- ¹ Laboratory of pharmacology, Service Pharmacie, Paul Brousse Hospital, AP-HP, 14 avenue Paul Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France
- ² UPRES EA 4123 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris XI, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, cedex, France
- ³ Hepatobiliary center, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France
- ⁴ Laboratory of biochemistry, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France
- ⁵ Statistical Units, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

ABC transporters	ATP-binding cassette transporters
ABCB1	ABC subfamily B member 1
ABCG2	ABC subfamily G member 2
HCC	Hepatocellular carcinoma
Bid	Twice daily
AUC0–12	Area under the plasma concentration–time curve over 12 h
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
UGT1A9	Uridine diphosphate glucuronyl transferase 1A9
C3	Concentration 3 h after drug administration
HPLC-UV	High performance liquid chromatography with ultraviolet detection
AFP	Alpha-fetoprotein
SD	Standard deviation

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth cancer in the world in prevalence and the most common primary liver cancer. It is the second most common cause of cancer deaths worldwide [1]. It almost always occurs on a pre-existing liver disease, mainly cirrhosis (90% of the cases); rarely in steatosis and exceptionally in healthy liver [2, 3]. The risk is highest in liver cirrhosis post-hepatitis C, hepatitis B and post-hemochromatosis. It is slightly lower in post-alcoholic cirrhosis [3–5]. When HCC is diagnosed early, treatment can be curative (surgical resection, percutaneous destruction, liver transplantation). However, 50–70% of cancers are diagnosed late. In this situation, only regional or systemic palliative treatments are possible. No palliative treatment was effective until the advent of targeted therapies in 2007. These treatments combined with technological advances in interventional radiology, and radiotherapy opened new perspectives [6]. Sorafenib was the first drug that gave good positive results in SHARP trial [7].

Sorafenib like other tyrosine kinase inhibitors (TKI) is an oral multitarget tyrosine kinase inhibitor (CRAF, BRAF, V600E BRAF, FLT3, and C-KIT); it also inhibits tumor vasculature (CRAF, VEGF-R1, R2 and R3, PDGFR b). It is indicated in the treatment of advanced HCC, advanced renal cell carcinoma after failure of previous treatment with interferon alfa or interleukin-2 in patients in whom these therapies were inadequate [7–9] and in progressive, locally advanced or metastatic differentiated thyroid carcinoma.

Mean oral bioavailability of sorafenib is about 22% [9]. Following oral administration, the peak of plasma concentration is reached after 3 h while the steady state concentration is reached after 7 days of repeated administrations.

In vitro studies showed that sorafenib was moderately transported by P-glycoprotein (P-gp) and more efficiently by breast cancer resistance protein (BCRP) [10] which could reduce its intestinal absorption. It is highly bound to human proteins (99.5%) and has two pathways of metabolism: oxidative metabolism mediated by cytochrome P450 (CYP450) 3A4 and glucuronidation by uridine diphosphate glucuronyl transferase UGT1A9. Conjugated forms of sorafenib can be hydrolyzed by bacterial glucuronidase activity in the gastrointestinal tract and then reabsorbed. The major circulating metabolite in plasma (9–16%) is the N-oxide pyridine which shows a comparable in vitro activity to that of sorafenib. After 14 days, 96% of the administered dose are eliminated, 77% in the feces and 19% in urine as glucuronidated metabolites.

Therapeutic monitoring of sorafenib is important since there is a large interindividual variability in plasma concentrations [11, 12].

The aim of our study was to evaluate efflux transporters P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) genetic polymorphism influence on sorafenib pharmacokinetics in routine therapeutic monitoring in patients treated for advanced HCC.

Materials and methods

Reagents

Sorafenib was purchased from Bayer Pharma® (Müller-Strabe, Berlin, Germany), erlotinib (internal standard, IS) from LC® laboratories (Woburn, USA), ethyl acetate, acetonitrile and dimethylsulfoxide (DMSO) from VWR® (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium acetate was purchased from Sigma® (St. Louis, MO, USA). Deionized purified water was prepared in our laboratory using DirectQ UV® (System, Millipore SAS®, Molsheim, France).

Patients

47 consecutive patients with advanced HCC, treated for the first time with single agent sorafenib in the Hepatobiliary Center of Paul Brousse Hospital in Paris, France, were enrolled in our study. All patients were treated with sorafenib as single agent at a dose of 400 mg b.i.d given on a continuous, uninterrupted schedule. All the patients gave their written informed consent for clinical, pharmacokinetics and genetics analyses, in keeping with French Bioethics Law and the Declaration of Helsinki, and with the approval from the Bicêtre Hospital ethics committee.

(Comité de protection des personnes Ile de France, Hôpital Bicêtre).

Sorafenib pharmacokinetic analysis

The study was done in patients the 15th day after the start of treatment and 3 h (C3) after 400-mg sorafenib administration, corresponding to the treatment equilibration. Blood samples were drawn into 5-mL lithium heparinized vacutainer tubes and plasma concentrations of sorafenib were determined. After centrifugation at 3000 rpm for 5 min at 4 °C, plasma was transferred to propylene tubes and stored at −20 °C until assay.

We used Shimadzu® chromatography system with UV detector and Labsolutions® chromatography workstation (Shimadzu Corporation®, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was achieved on a C18 ultrasphere ODS® column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex®, Pecq, France) associated with a guard column packed with the same phase.

Sorafenib plasma concentrations were determined by HPLC [13]. The method was validated according to the recommendations for bioanalytical method validation [12]. The calibration was linear in the range of 0.5–20 mg/L. The accuracy, within-assay and between-assay precision of the method was 96.9–104.0%, 3.4–6.2 and 7.6–9.9%, respectively. The composition of the mobile phase was 40% ammonium acetate (20 mM) and 60% acetonitrile.. To objectively evaluate sorafenib exposure variation, we used the concentration 3 h after administration (C3)/(dose/body weight) in mg per kg body weight.

Genotype determination

DNA extraction and MassARRAY genotyping

All enrolled patients were genotyped for two polymorphisms of ABCB1 (rs2032582; rs1045642) and three polymorphisms of ABCG2 (rs2231137; rs2231142; rs2622604). Genomic DNA was extracted from blood using a QIAamp DNA® mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instruction. The concentration and purity of the DNA were determined by absorbance at 260 and 280 nm using a Nanovue® spectrophotometer. The genotyping was performed on the Sequenom Massarray® platform (Sequenom, San Diego, CA, USA). The panel was used with Typer Assay designer software and iPLEX Gold® biochemistry. Primers and probe used are presented in Table 1. PCR primers and extension primers were mixed in a unique pool. These primers were used for amplification of target regions and subsequent interrogation of the specific base composition at the target site using single base extension according to the manufacturer's instruction. Briefly, after DNA dilution multiplexed PCR was performed in 5 µl volumes. The amplification protocol comprised an initial incubation at 94 °C for 4 min; 45 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 62 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; and final incubation at 72 °C for 3 min. Unincorporated deoxynucleoside triphosphates were dephosphorylated by the addition of 2 µl of premix including 0.3 U of shrimp alkaline phosphatase (Sequenom). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 40 min, after which the phosphatase was inactivated by incubation for 5 min at 85 °C. Final primer extension was carried out using primer extension probes, the appropriate

Table 1 Primers and probe used

Primer's sequences	
ABCG2rs2231142_F	ACG-TTG-GAT-GTG-ATG-TTG-TGA-TGG-GCA-CTC
ABCG2rs2231142_R	ACG-TTG-GAT-GGT-CAT-AGT-TGT-TGC-AAG-CCG
ABCG2rs2622604_F	ACG-TTG-GAT-GAC-TCT-GAA-AGC-ACT-GTT-TTG
ABCG2rs2622604_R	ACG-TTG-GAT-GCA-TTT-GAA-TGT-CAG-CTA-GTC
ABCG2rs2231137_F	ACG-TTG-GAT-GGA-TGT-CTT-CCA-GTA-ATG-TCG
ABCG2rs2231137_R	ACG-TTG-GAT-GTC-AGG-TCA-TTG-GAA-GCT-GTC
ABCB1rs1045642_F	ACG-TTG-GAT-GAC-TGC-AGC-ATT-GCT-GAG-AAC
ABCB1rs1045642_R	ACG-TTG-GAT-GAA-GGC-ATG-TAT-GTT-GGC-CTC
ABCB1rs2032582_F	ACG-TTG-GAT-GGA-AAA-TGT-TGT-CTG-GAC-AAG-C
ABCB1rs2032582_R	ACG-TTG-GAT-GCA-TAT-TTA-GTT-TGA-CTC-ACC
Probe's sequences	
ABCG2rs2231142_E	AGA-GCT-GCT-GAG-AAC-T
ABCG2rs2622604_E	CTC-TTC-CTT-ACT-ACT-CTG-G
ABCG2rs2231137_E	TGT-CGA-AGT-TTT-TAT-CCC-A
ABCB1rs1045642_E	CTT-TGC-TGC-CCT-CAC
ABCB1rs2032582_E	AGA-TAA-GAA-AGA-ACT-AGA-AGG-T

dNTP/ddNTP combination and 0.5 units of Thermosequence DNA polymerase. Reactions were cycled at 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 5 s and 5 cycles of 52 °C for 5 s and 80 °C for 5 s; and final incubation at 72 °C for 3 min. After addition of a cation exchange resin to remove residual salt formed during the reactions, 7 nl of the purified primer extension reaction was loaded onto a matrix pad of a spectroCHIP® (Sequenom). SpectroCHIPS® were analyzed using MALDI-TOF® mass spectrometer.

Genotype distribution

Genotype distribution of the different polymorphisms of P-glycoprotein and BCRP in the patient's population is presented in Table 2. In our population, we identified three groups for each of 3435 C>T and 2677 G>T/A SNPs in ABCB1 gene (encoding P-gp) and for 1143C>T SNP in ABCG2 gene (encoding BCRP); a wild-type group, a heterozygous group and a mutant group. Nevertheless, for the 34 G>A and 421 C>A SNPs in ABCG2 gene, only two groups were identified; a wild-type group and a heterozygous group. Variant allele frequencies estimated on the study population of 47 patients were in accordance with those observed in the study population; genotypes were distributed according to the Hardy Weinberg equilibrium except for 2677 G>T/A SNP (in ABCB1 gene encoding the P-gp).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SAS® software version 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The following parameters were tested: age, sex, weight, alpha-feto-protein (AFP); alanine aminotransferase (ALAT); aspartate aminotransferase (ASAT), Albumin, concentration 3 h after administration (C3)/ (dose/body weight) in mg per kg body weight ratio, ABCG2 and ABCB1 polymorphisms and clinical evaluation of the patient.

The statistical tests used were: ANOVA variance analysis test to compare continuous numeric variables between more than 2 groups; Student's *t* test to compare continuous numeric variables between 2 groups; Chi2 test to compare qualitative variables between more than

2 groups; Chi2 test or Fisher's exact test if necessary (expected frequency < 5) to compare qualitative variables between 2 groups; and correlation tests to measure the strength of the linear relationship between two continuous variables: Pearson correlation coefficient and *p* value (two sided) associated. The test is significant if the *p* value < 0.05.

Clinical evaluation

The clinical evaluation was assessed by the physician on the basis of radiological appreciation after 3 months of treatment according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). It was expressed as percentage of patients whose disease progressed or were stabilized.

Results

Patients

Forty seven adult patients (41 males and 6 females) with advanced HCC (38 Child Pugh A and 9 Child Pugh B) were enrolled in our monocentric study. Table 3 represents the baseline characteristics of the study population.

After failure of anterior systemic chemotherapy, radiotherapy and/or chemoembolization, all patients were treated with sorafenib as single agent at a dose of 400-mg bid. Given on a continuous, uninterrupted schedule. 11 of the 47 patients had their dose reduced to 200-mg bid due to side effect problems. Drug-related adverse events were mainly mild to moderate and included hand foot syndrome, diarrhea, hypertension, (Table 4).

Sorafenib Pharmacokinetic results

The results of sorafenib plasma dosages 3 h after administration, concentration/(dose/body weight) are presented in Table 5. These results show sorafenib high inter-individual pharmacokinetic variability among the studied population,

Table 2 Genotype distribution of the different polymorphisms of HCC patients population

Gene	Identification number	SNPs	SNPs location
P-glycoprotein (ABCB1)	rs2032582	3435 C>T (<i>n</i> = 47)	Coding region
	rs1045642	2677 G>T/A (<i>n</i> = 47)	Coding region
BCRP (ABCG2)	rs2231137	34 G>A (<i>n</i> = 47)	Coding region
	rs2231142	421 C>A (<i>n</i> = 47)	Coding region
	rs2622604	1143 C>T (<i>n</i> = 47)	Intronic region

SNP single-nucleotide polymorphism

Table 3 Baseline characteristics of HCC patients population (study group)

Baseline characteristics	N=47
Demographic data	
Gender, n (%)	
Male	41 (87)
Female	6 (13)
Age in years	64 [41–82]
Weight in kg	77.2 [49–135]
Child pugh score	
Child pugh A	38 (80.8%)
Child pugh B	9 (19.2%)
Causes of HCC	
Cirrhosis	40 (85%)
Virus	17 (35.4%)
HBV	3 (6.5%)
HCV	13 (2.1%)
HBV + HCV	1 (2.1%)
Alcohol	22 (45.8%)
NASH	9 (18.8%)
Autoimmune liver disease	1 (2.1%)
Non-cirrhosis	7 (15%)
Hemochromatosis	3 (6.4%)
Fibro steatosis	3 (6.4%)
Healthy liver	1 (2.2%)
Baseline biological data	
AFP (UI/L)	1143.74 [1.8–12816]
Albumin (g/L)	33.31 [21.9–41.1]
ALT (UI/L)	65.68 [10–227]
AST (UI/L)	101 [22–271]

Results are expressed as median [interquartile range]

AFP alpha-fetoprotein, ALT alanine aminotransférase, AST aspartate aminotransférase

No significant differences in sorafenib plasma concentrations regarding sex, age and albumin were observed

No significant difference was found between AFP, ALAT and ASAT levels before and after treatment

P-glycoprotein genotype polymorphisms (ABCB1) (Table 6)

rs2032582 polymorphism: 3435 C>T SNP

From the 47 patients, our analysis included 36 patients, 11 were excluded because sorafenib dose had to be reduced to 200 mg b.i.d. due to side effects.

There is a correlation between sorafenib pharmacokinetics and the presence of 3435C>T SNP. Concentration/(dose/body weight) ratio was significantly lower in heterozygous group for the mutation (CT) compared to homozygous groups (wild-type and mutant-type).

Concentration/(dose/body weight) ratio was higher in mutant group TT than in wild-type group CC, however this difference was not statistically significant.

rs1045642 polymorphism: 2677 G/TA SNP

Concentration/(dose/body weight) ratio was higher in the mutant group than in the heterozygous group and in the wild-type group. Nevertheless this difference was not statistically relevant.

BCRP genotype polymorphisms (ABCG2) (Table 7)

rs 2,231,137 polymorphism: 34 G>A SNP

We found a correlation between concentration/(dose/body weight) ratio and the 34 G>A SNP. Heterozygous group AG had a significantly lower concentration/(dose/body weight) ratio (0.8 kg/L $\pm$ 0.4, $p=0.02$) than wild-type group GG (1.4 kg/L $\pm$ 1.5).

rs 2,231,142C polymorphism: 421 C>A SNP

The heterozygous group AG had a significantly lower concentration/(dose/body weight) ratio (0.5 kg/L $\pm$ 0.5, $p=0.007$) than the wild-type group CC (1.4 kg/L $\pm$ 1.4).

rs 2,622,604T polymorphism: 1143 C>T SNP

We found that the concentration/(dose/body weight) ratio was lower in the heterozygous group. However, this difference was not statistically significant.

The group homozygous for the mutation had higher values of concentration/(dose/body weight) ratio than the wild-type group. This difference was not statistically significant.

In conclusion, significant associations between sorafenib exposure and efflux transporters genotype polymorphisms were observed for ABCB1 3435 C>T SNP (P-gp genotype) and ABCG2 34 G>A, ABCG2 1143 C>T and ABCG2 421 C>A (BCRP genotype) SNPs, but not for ABCB1 2677 G>TA SNP (P-gp genotype).

Clinical evaluation

The proportions of patients whose disease had progressed or who were stabilized on the basis of the physician's evaluation for each studied polymorphism are presented in Table 8. We noticed that the heterozygous group for each mutation presented the higher proportion of patients whose disease was stabilized. However, this difference was not statistically relevant.

Table 4 Distribution of toxicity grades occurring during the first 15 th of treatment

Toxicity by grade	Occurrence during first 15 th day n (%)
Hand–foot skin reaction (HFSR)	
No	38 (81)
Yes	
<2	7 (15)
≥2	2 (4)
Hypertension	
No	45 (96)
Yes	
<2	2 (4)
≥2	0 (0)
Diarrhea	
No	25 (53)
Yes	
<2	18 (38)
≥2	4 (9)

Diarrhea was the side effect the most often observed during the first days of the treatment

Table 5 Sorafenib pharmacokinetic parameters of HCC patients

Parameter	Mean ± SD	Range	Relative standard deviation (RSD) (%)
Concentration at 3 h (C3) (mg/L)	5.3 ± 4.4 (n=47)	0.7–19.4	83
Concentration/(dose/body weight) (kg/L)	1.3 ± 1.4 (=47)	0.1–6.6	107

Discussion

Several studies have been initiated with a view to improving the safety of sorafenib in patients with different types

of cancers, in particular, liver and kidney cancers, which revealed a high variability in the pharmacokinetic parameters. The appearance of certain secondary agents at the beginning of treatment, but also a reduction of the exposure to sorafenib over time for various reasons, including a possible efflux by transporters (p-gp BRCP) [14–17]. In our preliminary study which was carried out that in patients with the CHC, we found that sorafenib has a high inter-individual pharmacokinetic variability. In fact, among the 36 patients, mean sorafenib plasma concentration was 5.3 mg/L with a relative standard deviation (RSD) of 83%. This was in line with all conducted studies in sorafenib patient's pharmacokinetics [16, 18, 19]. However, parameters influencing sorafenib exposure were different from a study to another. Regarding the relation between sorafenib pharmacokinetics and efflux transporters pharmacogenetic polymorphisms, the variation of sorafenib concentration in the studied polymorphisms revealed that in our population, ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT and ABCG2 421CA heterozygous genotypes were significantly associated with altered sorafenib plasma normalized concentrations levels compared to homozygous genotypes (wild type or mutant type).

In 3435 C>T SNP of P-gp gene, heterozygous group (40% of the study population) presented significantly the lowest concentration/(dose/body weight) ratio ($p=0.04$ CT versus CC; $p=0.035$ CT versus TT). A study conducted on HCC patients [20], and evaluating the same polymorphism (3435 C>T of *ABCB1*) found that P-gp expression was mostly expressed in tumor cells of patients with genotype CT. These results showed that the studied functional polymorphisms of P-gp gene affected differently P-gp expression and activity in vivo. It varies from healthy patients to patients having HCC and from tumor tissues to non-tumor tissues. These facts could explain the relatively low plasma concentrations in patients heterozygous for the studied polymorphism.

Boudou-Rouquette et al. [16] found that patients with ABCG2 1143CT genotype had the lowest sorafenib exposure. They concluded to the non-relevance of genetic

Table 6 Correlation between sorafenib pharmacokinetic parameters and P-glycoprotein in patients with HCC

Gene	SNPs	Genotype	Concentration at 3h/ (dose/body weight) (mean ± SD) (kg/l)
P-glycoprotein (ABCB1)	3435 C>T	CC	1.3 ± 0.9 (n=14)
		CT	0.7 ± 0.6* (n=16)
		TT	2.3 ± 2.2† (n=6)
	2677 G>T/A	GG	1 ± 0.8 (n=24)
		GT	1.3 ± 1 (n=6)
		TT	2.1 ± 2.19 (n=6)

* $p=0.04$; CC versus CT, † $p=0.035$; CT versus TT

Table 7 Correlation between sorafenib pharmacokinetic parameters and BCRP in patients with HCC

Gene	SNPs	Genotype	Concentration at 3h/(dose/body weight) (mean±SD) (kg/l)
BCRP (ABCG2)	34 G>A	GG	1.4±1.5* (n=29)
		AG	0.8±0.4 (n=9)
	421 C>A	CC	1.4±1.4 [‡] (n=32)
		CA	0.5±0.5 (n=4)
	1143 C>T	CC	1.6±1.6 (n=18)
		CT	0.9±0.7 (n=15)
		TT	2±2.4 (n=3)

**p*=0.02; GG versus AG, [‡]*p*=0.007; CC versus CA

Table 8 Patients clinical evolution according to the RECIST criteria for the different polymorphisms

Gene	SNPs	Genotype	Clinical evolution Progression (%)
P-glycoprotein (ABCB1)	3435 C>T	CC	40
		CT	13.3
		TT	25
	2677 G>T/A	GG	20
		GT	12.5
		AA/TT	33.3
BCRP (ABCG2)	34 G>A	GG	26.9
		AG	14.3
	421 C>A	CC	33.3
		CA	23.3
	1143 C>T	CC	28.6
		CT	17.6
		TT	50

Heterozygous group for each mutation had the best clinical evolution
No significant correlation between P-gp polymorphisms and clinical evolution was found

variants of efflux transporters in sorafenib exposure since the observed differences were not statistically significant.

In our study, patients heterozygous for the studied polymorphisms presented a tendency to have the best clinical evolution. In these patients, sorafenib mean plasma concentrations were the lowest. Thus, the heterozygous group could be associated to a better therapeutic response and therefore, to a better clinical evolution. In the literature, the implication of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms in the susceptibility to develop HCC [21, 22], the therapeutic response [23] and the risk of recurrence of HCC after liver transplant was reported [22]. All these factors could explain the implication of the studied polymorphisms in therapeutic response.

We also studied various interactions between the different polymorphisms to see their incidence on sorafenib concentration, and analyzed the biological parameters such as AFP ALAT, ASAT, and albumin before and after treatment without any statistical difference were noted, may be due to small number of patients.

We also noted side effects, such as HFSR, hypertension, and mainly diarrhea. This toxicity regressed later, except for some patients, in whom we had to decrease the doses, and those patients were eliminated for final analysis.

A study investigated SNPs of OATP1B1, OATP1B3, ABCC2, ABCG2, UGT1A1 and UGT1A9 genes [24] found that none of the SNPs were associated to progression free survival (PFS) for HCC in univariable analysis. For overall survival (OS), the recessive ABCC2 and ABCG2 models seemed associated, but both models had only two patients in the homozygous affected group and were therefore excluded.

Finally, the hypothesis that heterozygous groups for the studied polymorphisms have the best drug response and the best clinical evolution has to be confirmed by multicenter studies with more patients and more parameters.

Conclusion

In this study, we evaluated the influence of efflux transporters polymorphisms on the pharmacokinetics of sorafenib in actual conditions of its use in patients treated for HCC in our hospital. All patients with HCC treated with sorafenib were included. We observed a pharmacogenetic and pharmacokinetic inter-individual variability of sorafenib exposure. In this preliminary study ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143 CT and ABCG2 421 CA polymorphisms were significantly associated with altered sorafenib plasma normalized levels. In fact, there is a tendency to get a better clinical response in the heterozygous group than in the homozygous group (wild-type and mutant type), all studied polymorphisms included. No statistically significant correlation was found between treatment efficacy,

plasma concentrations and polymorphisms studied, but only a tendency was observed. Further studies with a larger number of patients, taking into account other biological and genetic parameters could confirm or not this observation, and make it possible to give more certain conclusions on the use of genetic tests in the choice of treatments.

Acknowledgements We thank Mrs Sylvie MAHE for blood samples collection and Dr. Simone ORBACH for helping in the preparation of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- McGlynn KA, Petrick JL, London WT (2015) Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 19(2):223–238
- Maillard E (2011) Épidémiologie, histoire naturelle et pathogénèse du carcinome hépatocellulaire. *Cancer/radiothérapie* 15(1):3–6
- Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J et al (2008) Associations between Hepatitis B Virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl cancer Inst* 100:1134–1143
- Bruno S, Crasignani A, Maisonneuve P, Rossi S, Sitini E, Mandelli MU (2007) Hepatitis C Virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma on patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology* 46:1350–1356
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Danata F (2004) Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factor. *Gastroenterology* 127(5):35–50
- Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Bublin T, Decosterd LA (2011) Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib and nilotinib. *Blood* 117(8):e75–e87
- Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Raoul J, Zeuzen S et al (2007) Sorafenib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma, (HCC): results of a phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). *J Clin Oncol* 18 S:25
- European Medicines Agency (EMA), NEXAVAR: EPAR—Scientific Discussion, 2007, [Internet], Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000690/WC500027707.pdf [Consulted 12 May 2015].
- Monograph of sorafenib. VIDAL Ed. 2014.
- Ichiro I (2012) Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet* 27(1):85–105
- Blanchet B, Billemont B, Cramard J, Benichou AS, Chhun S, Harcouet L et al (2009) Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *J Pharm Biomed Anal* 49(4):1109–1114
- Fucile C, Marengo S, Bazzica M, Zuccoli ML, Lantieri F, Robbiano L et al (2015) Measurement of sorafenib plasma concentration by high-performance liquid chromatography in patients with advanced hepatocellular carcinoma: is it useful the application in clinical practice? A pilot study. *Med Oncol* 32(1):1–7
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ et al (2000) Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17(12):1551–1557
- Arrondeau J, Mir O, Boudou-Rouquette P, Coriat R, Ropert S, Dumas G et al (2012) Sorafenib exposure decreases over time in patients with hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs* 30(5):2046–2049
- Boudou-Rouquette P, Ropert S, Mir O, Coriat R, Billemont B, Tod M et al (2012) Variability of sorafenib toxicity and exposure over time: a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Oncologist* 17(9):1204–1212
- Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, Thomas-Schoemann A, Mir O, Taieb F et al (2012) Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PloS One* 7(8):e42875
- Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendliss A et al (2007) Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist* 12(4):426–437
- Jain L, Woo S, Gardner ER, Dahut WL, Kohn EC, Kumar S et al (2011) Population pharmacokinetic analysis of sorafenib in patients with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol* 72(2):294–305
- Van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ (2009) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 35:692–706
- Baldissera VD, de Mattos AA, Coral GP, de Araujo FB, Maroni CA, de Mello Brandão AB et al (2012) Evaluation of the C3435T polymorphism in the MDR1 gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 11(6):899–906
- Fukuda M, Kawahara Y, Hirota T, Akizuki S, Shigeto S, Nakajima H et al (2010) Genetic polymorphism of hepatic ABC transporter in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Ther* 1(3):114–123
- Gao J, Dafeng People' Hospital (2013) Association of MDR1 gene polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma in the Chinese han population. *Braz J Med Biol Res* 46(3):311–317
- Timucin M, Algozlu H, Ozdemir S, Ozdemir O, Association between ABCB1 (2013) (MDR1) gene polymorphism and unresponsiveness combined therapy in chronic Hepatitis C virus. *Hepat Mon* 13(4):e7522
- Bins S, Lenting A, El Bouazzaoui S et al (2016 Sep) Polymorphisms in *SLCO1B1* and *UGT1A1* are associated with sorafenib-induced toxicity. *Pharmacogenomics* 17(14):1483–1490

Discussion :

Plusieurs études pharmacocinétiques ont été menées en vue d'améliorer la sécurité d'utilisation du sorafénib chez des patients atteints de différents types de cancers, en particulier des cancers du foie et des reins, et ont montré une grande variabilité de ses paramètres pharmacocinétiques. L'apparition de certains effets indésirables au début du traitement, mais aussi une diminution de l'exposition au sorafénib dans le temps pour diverses raisons, y compris un éventuel efflux par les transporteurs (P-gp BCRP) ont été rapportés [90, 91, 92, 93]. Dans notre étude préliminaire qui a été réalisée chez des patients atteints de CHC, nous avons constaté que le sorafénib avait une grande variabilité pharmacocinétique inter-individuel. En fait, parmi les 36 patients, la concentration plasmatique moyenne de sorafénib était de 5,3 mg / L avec un écart-type relatif (RSD) de 83% en accord avec les études réalisées précédemment [92, 94, 95]. Cependant, les paramètres influençant l'exposition au sorafénib étaient différents d'une étude à l'autre. En ce qui concerne nos travaux une relation entre la pharmacocinétique du sorafénib et les polymorphismes génétiques de transporteurs d'efflux, a été retrouvée pour les polymorphismes étudiés. Les génotypes hétérozygotes ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT et ABCG2 421CA étaient significativement associés aux concentrations les plus faibles de sorafénib, normalisées aux poids comparativement aux génotypes homozygotes (type sauvage ou mutant). Chez les patients 3435 C> T SNP du gène de la P-gp, le groupe hétérozygote (40% de la population étudiée) présentait de façon significative le plus faible rapport concentration / (dose / poids corporel) ($p = 0,04$, CT versus CC, $p = 0,035$, CT versus TT). Une étude réalisée chez des patients porteurs de CHC [96], et évaluant le même polymorphisme (3435 C> T de ABCB1) a trouvé que la P-

gp était principalement exprimée dans des cellules tumorales de patients ayant un génotype CT. Ces résultats ont montré que les polymorphismes fonctionnels étudiés du gène de la P-gp affectaient différemment l'expression et l'activité de la P-gp *in vivo*. Ils varient selon que les patients sont en bonne santé ou ont un CHC et ils varient également selon que les tissus sont tumoraux ou non tumoraux. Ces faits pourraient expliquer les concentrations plasmatiques relativement faibles de sorafénib chez les patients hétérozygotes pour le polymorphisme étudié.

Boudou-Rouquette et coll. [92] ont constaté que les patients présentant un génotype ABCG2 1143CT avaient la plus faible exposition au sorafénib. Ils ont conclu à la non pertinence des variants génétiques des transporteurs d'efflux dans l'exposition au sorafénib puisque les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives.

Dans notre étude, les patients hétérozygotes pour les polymorphismes étudiés présentaient une tendance à une meilleure évolution clinique. Chez ces patients, les concentrations moyennes plasmatiques de sorafénib étaient les plus faibles. Ainsi, le groupe hétérozygote pourrait être associé à une meilleure réponse thérapeutique et donc à une meilleure évolution clinique. Dans la littérature, une implication des polymorphismes ABCB1 et ABCG2 dans la susceptibilité au développement du CHC [97, 98], la réponse thérapeutique [99] et le risque de récurrence du CHC après transplantation hépatique [98] ont été rapportés. Tous ces facteurs pourraient expliquer l'implication des polymorphismes étudiés dans la réponse thérapeutique.

Nous avons également étudié différentes interactions entre les différents polymorphismes pour évaluer leur incidence sur la concentration du sorafénib, et

analysé des paramètres biologiques tels que l'alfa foetoprotéine (AFP) les transaminases (ALAT ASAT) et l'albumine avant et après le traitement. Aucune différence statistique n'a été retrouvée, peut-être en raison de la faible taille de notre échantillon.

Nous avons également noté des effets indésirables, tels que le syndrome main-pied, de l'hypertension, et principalement de la diarrhée. Ces toxicités ont régressé par la suite, à l'exception de quelques patients, pour lesquels les doses ont dû être diminuées, et ces patients n'ont pas été inclus dans l'analyse finale des résultats.

Une étude portant sur les SNPs des gènes OATP1B1, OATP1B3, ABCC2, ABCG2, UGT1A1 et UGT1A9 [100] a montré qu'aucun des SNPs n'était associé à la survie sans progression (PFS) des patients atteints de CHC dans le cadre d'une analyse uni variée. Les génotypes ABCC2 et ABCG2 récessifs semblaient être associés à la survie globale (OS), mais il n'y avait que deux patients dans le groupe homozygote et ils ont donc été exclus.

Enfin, l'hypothèse selon laquelle les groupes hétérozygotes pour les polymorphismes étudiés ont eu la meilleure réponse médicamenteuse et la meilleure évolution clinique doit être confirmée par des études multicentriques comportant plus de patients et plus de paramètres à étudier.

Conclusion :

Dans cette étude, nous avons évalué l'influence des polymorphismes génétiques des transporteurs d'efflux sur la pharmacocinétique du sorafénib dans les conditions réelles de son utilisation chez les patients traités pour un CHC au centre hépatobiliaire de l'hôpital Paul Brousse. Tous les patients avec un CHC traité avec du sorafénib ont été inclus pendant deux ans. Nous avons observé une variabilité inter-individuelle pharmacogénétique et pharmacocinétique de l'exposition au sorafénib. Dans cette étude préliminaire, les génotypes hétérozygotes des polymorphismes ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143 CT et ABCG2 421 CA étaient significativement associés à de faibles concentrations plasmatiques de sorafénib normalisées aux poids. En fait, une tendance à une meilleure réponse clinique a été retrouvée dans le groupe hétérozygote comparativement au groupe homozygote (type sauvage et mutant), pour tous les polymorphismes étudiés. Aucune corrélation statistiquement significative n'a été retrouvée entre l'efficacité du traitement, les concentrations plasmatiques et les polymorphismes étudiés, mais seule une tendance a été observée. D'autres études avec un plus grand nombre de patients, avec la prise en compte d'autres paramètres biologiques et génétiques, pourraient confirmer ou non cette observation. Il sera ainsi possible de donner des informations plus précises sur l'utilisation des tests génétiques dans le choix des traitements.

Article 2: Bevacizumab modulates P-glycoprotein function *in vitro* and increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice.

**Accepté pour publication dans Research & Reviews in Pharmacy
&Pharmaceutical Sciences Journal RRJPPS | Volume 6 | Issue 4 |
September, 2017 e-ISSN:2320-1215 p-ISSN:2322-0112**

Introduction :

L'introduction de nouveaux médicaments de thérapie ciblée, comme le bévacizumab et le cétuximab, combinés à des médicaments de chimiothérapie classique dans le traitement des cancers, a entraîné une augmentation de la survie des patients [101].

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé, qui se lie au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), facteur clé de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, et inhibe ainsi la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), à la surface des cellules endothéliales. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF entraîne une régression de la vascularisation des tumeurs, normalise la vasculature tumorale restante et inhibe la formation d'un nouveau système vasculaire tumoral, inhibant ainsi la croissance tumorale.

Cependant, une résistance intrinsèque et acquise est souvent observée, et l'acquisition de la «résistance à plusieurs médicaments» ou « Multidrug Resistance » (MDR) finit par entraîner l'échec du traitement systémique du cancer. De nombreuses tumeurs surexpriment la P-glycoprotéine (P-gp), une pompe d'efflux liée à la résistance et au phénomène de Multi Drug Résistance, ce qui réduit fortement l'activité de ses substrats. L'efflux actif des médicaments anticancéreux à partir de cellules tumorales par des protéines transmembranaires de la famille des transporteurs à ATP Binding Cassette (transporteurs ABC) a été largement rapporté comme un mécanisme potentiel de résistance cliniquement pertinent [102]. La P-gp joue un rôle majeur dans le phénomène de résistance.

L'irinotécan et le SN-38 sont des substrats de la P-gp, leur efflux par cette dernière entraîne une diminution de leurs concentrations intracellulaires. L'invasion tumorale ou métastase et la résistance multiple aux médicaments sont les principales causes de l'échec thérapeutique et de la mortalité élevée chez les patients atteints de tous types de cancers.

Dans une précédente étude [103], nous avons montré que le cétuximab, un anticorps monoclonal se liant au récepteur du facteur de croissance épidermique, pouvait moduler la fonctionnalité de la P-gp, entraînant une augmentation de l'accumulation intracellulaire de certains substrats de la P-gp comme l'adriamycine et une augmentation significative (1,7 fois) des concentrations du SN-38 dans le plasma et dans la tumeur chez des souris porteuses d'une xénogreffe de tumeur colorectale et prétraitées avec le cétuximab.

Wang et al [104] ont confirmé que le cétuximab peut améliorer l'efficacité des médicaments de chimiothérapie sur des cellules cancéreuses surexprimant la P-gp.

Li L. *et al.* 2009 [105] ont montré une synergie d'action entre la P-gp et le VEGF vis-à-vis de l'invasion de cellules HEP2T de carcinome du larynx humain *in vitro*. De plus, il a été démontré que le niveau de VEGF était lié à l'expression de la P-gp dans les cellules cancéreuses K562 / A02 : l'action du trioxyde d'arsenic contribuait à la réversion de la résistance de ces cellules en diminuant l'expression de la P-gp [106].

Broggini-Tenzer A. *et al.* [107] ont montré que le bévacizumab resensibilise des agents stabilisants des microtubules comme le paclitaxel sur des tumeurs surexprimant la P-gp, ce qui soutient l'étude clinique précédente.

Nous étudions ici, les effets d'un prétraitement avec le bévacicumab sur la fonctionnalité de la P-gp *in vitro et in vivo*.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé *in vitro* un de nos modèles de lignées cellulaires de cancer ovarien humain (IGROV1), résistantes à la doxorubicine et surexprimant la P-gp.

Nous avons aussi réalisé *in vivo* une étude pharmacocinétique comparative de l'irinotécan et de son métabolite actif (SN38) dans le plasma et dans la tumeur chez des souris greffées de tumeurs colorectales humaines, selon qu'elles étaient prétraitées ou non avec le bévacicumab.

Bevacizumab modulates P-glycoprotein function *in vitro* and increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice.

Mahamadou Tandia^{ab}, Jean-Meidi Alili^a, Chadi Abbara^{ac}, Marie-Sophie Noel-Hudson^b, Farah Ayadi^a, Mélanie Polrot^d, Patrick Gonin^d, Laurence Bonhomme-Faivre^{abe}

^a Laboratory of Pharmacology, Service Pharmacie, Hôpital Paul Brousse AP-HP, 14 avenue Paul-Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, France

^b UPRES EA 4123, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris-Sud XI, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France

^c Department of Pharmacology and Toxicology, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49100 Angers, France

^d Animal and Veterinary Resources, IFR 54, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

^e UMR-S 935, INSERM, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France

Keywords: Irinotecan, SN-38, bevacizumab, P-glycoprotein, pharmacokinetics, ABCB1

*Correspondence and reprints: mahamadou.tandia@aphp.fr

ABSTRACT

The overexpression of P-glycoprotein (P-gp) (ABCB1) is associated with multidrug resistance. Since irinotecan and its active metabolite are P-gp substrates, we tested whether bevacizumab, a monoclonal antibody directed toward VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), could modulate P-gp function.

The first objective of this study was to evaluate whether bevacizumab could increase intracellular concentration of doxorubicin (P-gp substrate) by interacting with P-gp.

The second objective was to document whether bevacizumab could modify irinotecan disposition in mice. Therefore, concentrations of irinotecan and its active metabolite SN-38 were measured by HPLC in plasma of nude mice and in plasma and tumor of mice bearing a human colorectal carcinoma xenograft when irinotecan is given orally (40 mg/kg) on day 3, alone or after a pretreatment with bevacizumab (5 mg/kg IP) on days 1 and 3.

For *in vitro* studies, two human ovarian carcinoma cells (IGROV1) overexpressing or weakly expressing P-gp were used. Bevacizumab effect on P-gp functionality was evaluated by measuring doxorubicin (P-gp fluorescent substrate) intracellular accumulation. Bevacizumab capacity to increase cytotoxicity was evaluated by MTT test

Exposure to bevacizumab with doxorubicin leads to a significant doxorubicin accumulation and a reversion of doxorubicin resistance in P-gp expressing cell lines.

Pharmacokinetic analysis showed a significant increase (1.7 fold) of irinotecan AUC and C_{max} (2 fold) in plasma after pretreatment with bevacizumab in human colorectal xenograft bearing mice. A non-significant increase in irinotecan tumors AUC (1.3 fold) and C_{max} (1.3 fold) and SN-38 AUC (1.4 fold) was observed in the bevacizumab treated group. A significant trough concentration of plasma SN-38 (3.9 times higher) in bevacizumab treated nude mice was also observed. Bevacizumab increases a P-gp substrate intracellular accumulation in cell lines suggesting that bevacizumab could influence irinotecan pharmacokinetic partly due to modulation of P-gp fonction.

INTRODUCTION

The introduction of new chemotherapeutic agents combined with targeted therapies for the treatment of cancers, such as bevacizumab (AVASTIN®) and cetuximab (ERBITUX®) lead to an increase in survival [1]. Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody binds to vascular endothelial growth factor (VEGF), the key driver of vasculogenesis and angiogenesis, and thereby inhibits the binding of VEGF to its receptors, Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2), on the surface of endothelial cells. Neutralizing the biological activity of VEGF leads to regression of the tumor vascularization, normalizes remaining tumor vasculature, and inhibits formation of new tumor vasculature, thereby inhibiting tumor growth.

However, intrinsic and acquired resistances are often observed, and acquisition of ‘multi-drug resistance’ (MDR) eventually causes failure of the systemic cancer treatment. Many tumors overexpress the multidrug resistance (MDR)-related efflux pump P-glycoprotein, thereby strongly reducing the potency of P-glycoprotein substrates. Active efflux of chemotherapeutic agents from tumor cells by transmembrane pumps of the ATP-binding cassette (ABC) family has been extensively reported as a potential clinically relevant mechanism of MDR [2]. P-glycoprotein (P-gp) has a major role in MDR. Irinotecan and SN-38 are substrates of P-gp, which can cause decreased intracellular levels of these drugs. Tumor invasion/metastasis and multidrug resistance (MDR) are the main causes of treatment failure and high mortality in all kinds of cancer patients. In a previous study [3], we showed that cetuximab, a monoclonal antibody directed towards epidermal growth factor receptor, could modulate P-glycoprotein (P-gp) functionality, and leads to an increased P-gp substrate intracellular accumulation of adriamycine in a cancerous line over expressing P-gp and also a significant increase (1.7-fold) in SN-38 disposition in plasma and in a tumor model of xenograft colorectal tumor after pretreatment with cetuximab. Wang et al [4] have confirmed that cetuximab enhanced the efficacy of chemotherapeutic agent in ABCB1 glycoprotein overexpressing cancer cells.

Li L. et al. 2009 [5] showed synergistic enhancing effects between MDR1/P-gp and VEGF vascular endothelial growth factor (VEGF) on human laryngeal carcinoma HEP2T cell invasion *in vitro*. Moreover, VEGF level was related to P-gp expression in K562/A02 cancer cells: the action of arsenic trioxide contributed to resistance reversion of those cells by decreasing P-gp expression [6].

In addition, Broggini-Tenzer A. et al. [7] have shown that bevacizumab regimens resensitized P-glycoprotein overexpression SW480-derived tumor xenografts to microtubule-stabilizing agents like paclitaxel thus supporting this previous clinical study.

We study here the effects of bevacizumab pretreatment on P-gp functionality, favoring a decrease in the efflux of co-administered P-gp substrates.

In order to achieve our objectives, we used *in vitro* one of our models of human ovarian cancer cell lines (IGROV1), resistant to doxorubicin, because of a high P-gp efflux. We also carried out *in vivo* a comparative

pharmacokinetic study of irinotecan and its active metabolite (SN38) in plasma and in tumors in colorectal tumorgraft bearing nude mice, whether or not pretreated with bevacizumab

MATERIALS AND METHODS

Drug

Doxorubicin was purchased from Teva (Paris France), verapamil from Abbott (Paris France).

Irinotecan (CAMPTO®) [40mg/2 mL] and bevacizumab (AVASTIN®) [25mg/mL] were purchased from Pfizer (Montrouge, France) and Roche Registration Limited (Welwyn Garden City, United Kingdom) laboratories, respectively. Chemicals Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM), foetal calf serum (FCS), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin, streptomycin, zeocin, hygromycin B. were purchased from Gibco Invitrogen (Cergy-Pontoise France).

Irinotecan (purity C 99 %) and SN-38 (purity C 98 %) were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

Acetonitrile and methanol (liquid-chromatography grade), tetrabutyl ammonium and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA), Acetic Acid were purchased from VWR BDH Prolabo (Haasrode, Belgium).

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin, France).

Cell lines

The IGROV1 cells were obtained from Dr. Bénard (Bénard et al., 1985) and the CNRS 8126 laboratory at Villejuif, France.

Establishment of sensitive and resistant doxorubicin cell lines: parental drug-sensitive cell line (IGROV1-p), doxorubicin-resistant cell line (IGROV1-DXR)

The IGROV1-p cell line was derived from a stage III human ovarian carcinoma. The characterization of the parental sensitive IGROV1-p has been reported previously [8, 9]. The IGROV1-DXR cells, which overexpressed P-gp, were selected from IGROV1-p cells by continuous exposure of these cells to increased concentrations of doxorubicin in a gradual step-wise manner, up to 0.1 µg/ml for doxorubicin. Cell lines were grown as adherent monolayers supplemented with 10% (v/v) FCS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. IGROV1-DXR cells were maintained in medium supplemented with doxorubicin (0.1 µg/ml).

Doxorubicin Accumulation Assay measured by flow cytometric analysis FACS

P-gp function assessment.

Cell-based doxorubicin transport assays were performed with IGROV1-p, and IGROV1-DXR cell lines. Cells were incubated in DMEM with doxorubicin alone (10 µM) plus 5% FBS during 2 h at 37 °C in order to

compare doxorubicin accumulation in the two cell lines. After incubation with doxorubicin, cells were washed twice with PBS and the cells dissociated with 0.05% Trypsin-EDTA buffer. Cells were re-suspended in DMEM plus 10% FCS and centrifuged. After washing three times with PBS, to eliminate extracellular doxorubicin fluorescence due to doxorubicin accumulation in the cells was measured by flow cytometry analysis (acquisition of data for 10,000 cells in channel 2 (FL2)). Results are expressed as total events.

Effect of bevacizumab on P-gp function in IGROV1-DXR lines

Effect of bevacizumab was tested at 2 different concentrations (1 mg/ml and 5mg/ml) according to the following protocol co-incubated in DMEM with doxorubicin 10 μ M and 5% FCS during 2 h at 37°C. Bevacizumab effect was also tested on IGROV1-p cells. Verapamil was used during doxorubicin incubation as a positive control at 10 μ M. P-gp function assessed by doxorubicin accumulation was expressed as percentage of doxorubicine accumulation through the following equation.

$$100 \times (\text{MFI bevacizumab} - \text{MFI control}) / \text{MFI control}.$$

MTT viability test

To measure bevacizumab cytotoxicity on IGROV1 cells, cell proliferation was determined by MTT assay. IGR-OV1 cells were plated at 20000 cells/well in 96-well plates and incubated, on attachment, in 200 μ L medium with bevacizumab. Two types of toxicity assay were performed: short-term (incubation during 2 hr, n=5) and long-term (incubation during 24 and 48 hours, n=8) of bevacizumab, at the concentrations of 0.0125 mg/ml, 0.5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml and 10.0 mg/ml in 10% FCS medium. The tetrazolium dye MTT (bromure de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)(Sigma-Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin, France) assay was used to evaluate the cytotoxicity of different drug concentrations, according to the procedure described by Mosman (1983) [10]. MTT test was performed with IGROV1-p and IGROV-DXR. Cells were treated with the detergent Triton X-100 1% in phosphate buffered saline (PBS) as the positive control for each set of experiments.

After bevacizumab incubation, cells were washed with PBS and MTT were added at the concentration of 0.5 mg/ml. After 4-hour incubation, formazan extraction was performed and the quantity was measured colorimetrically with ELISA at 570 nm using a multiwall-scanning spectrofluorometer (MRX II microplate reader, Dynex Technologies). Percentage of surviving of cells treated or not with bevacizumab was normalized to control, using the formula:

$$\text{Cell viability (\%)} = [(\text{Abs (sample)} - \text{Abs (pos. ctrl)}) / (\text{Abs (neg. ctrl)} - \text{Abs (pos. ctrl)})] \times 100$$

The experiments were performed in triplicate.

Human colorectal carcinoma xenograft bearing mice model

In this study was used a xenograft model originating from a human tumor collection, established under the CREMEC projet: the CR-IGR016P primary xenograft. The patient, from whom the tumor originated, was a

woman, with an adenocarcinoma of the sigmoid colon with ovarian metastases. The sample was directly derived from the primary tumor.

The CR-IGRO16P tissue was cut into small pieces. These tissues were subcutaneously implanted into female Foxn1nu CD-1 nude mice mouse flanks. These mice were purchased from Animal and Veterinary Resources, Institut Gustave Roussy, IFR54 (Villejuif, France). Mice were housed under standard laboratory sterile conditions, with sterile water and regular sterile (gamma-irradiated) chow provided *ad libitum* in a 12-h/12-h light/dark cycle at a 21-23°C temperature. Anesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane in air. When the tumor had reached 2-3 cm in diameter, it was sampled and cut into small pieces to obtain the second-passage model, which was used in the study. The animals were treated in accordance with the European Committee standards concerning the care and use of laboratory animals. The experimental Protocol was approved by Local Animal Experimentation Committee (N°26, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

Irinotecan and SN-38 pharmacokinetic studies

Six weeks old male nude mice (20–30 g) were purchased from Animal and Veterinary Resources of Gustave Roussy Institut (IGR Villejuif, France). 48 mice formed two groups, healthy mice and human colorectal carcinoma (CR-IGRO16P) tumor bearing mice. Water and food were available *ad libitum* throughout the studies. The 48 nude mice received irinotecan (40 mg/kg orally on day 3) either alone or after 5 mg/kg intraperitoneally bevacizumab on days 1 and 3. At the end of the experiments, animals were anaesthetized with isoflurane, blood was collected by cardiac puncture and mice were sacrificed by cervical dislocation. Tumors were removed from the surrounding conjunctive tissue, snap frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C.

For irinotecan and SN-38 assay, 400 µl blood were collected in heparinized tubes at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 8 h after irinotecan administration, three mice per point. Blood samples were centrifuged for 10 min at 6200 g. Plasmas were harvested into clean tubes and immediately analyzed.

The same experiment was done with human colorectal carcinoma bearing mice.

Irinotecan and SN-38 plasma concentrations were measured using HPLC coupled to a fluorescence detector. For analysis, 100 µl of plasma were mixed with 200 µl of acetonitrile acidified with acetic acid [20:1 (v/v)]. The mixture was vortexed for 10 sec and then centrifuged for 10 min at 5000 rpm at room temperature. The supernatant was evaporated under a gentle stream of nitrogen at 30°C. The residue was reconstituted in 200 µl of a 0.0025 M tetra butyl ammonium/acetonitrile/trifluoroacetic acid mixture [233:100:1 (v/v/v)] and vortexed for 10 sec. An aliquot of 40 µl was then injected into the chromatographic system.

Irinotecan or SN-38 was measured using a Nucleosil C18 column (4.6 x 125 mm, 3 µm) (Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was constituted of tetra-butyl-ammonium and trifluoroacetic acid [40000:1 (v/v)], acetonitrile and methanol [73:22:5 (v/v/v)] delivered at a flow rate of 1.2 ml/min. The eluent was monitored at 260 nm.

Irinotecan and SN-38 standard curves were correctly described by unweighted least-square linear regression. Over the irinotecan (or SN-38) plasma concentration range of 10–2500 ng/mL (5–1250 ng/mL), the determination coefficient (R^2) of the calibration curves remained >0.99 . Based on quality control samples, the overall relative SD (an index of precision) was less than 12%. The irinotecan and SN-38 lower limits of quantification were 10 and 5 ng/mL. Three irinotecan and SN-38 quality controls were prepared: low (30 and 15 ng/mL), medium (750 and 375 ng/mL) and high (2000 and 1000 ng/mL).

Irinotecan and SN-38 concentrations in tumor were measured using the same HPLC/UV method described above. For analysis, the tumor was cut into small pieces of approximately 25 mm³ and then mixed with 100 μ l of acetonitrile/water mixture [1:1 (v/v)]. Irinotecan and SN-38 were then extracted as described above. Calibration standards of irinotecan and SN-38 were prepared in drug-free tumors by spiking with concentrated standards to obtain a concentration range of irinotecan (or SN-38) between 0.5 and 50 ng/g (0.25–25 ng/g). Three irinotecan and SN-38 quality controls were prepared in drug-free tumors by spiking concentrated standards: low (1.5 and 0.75 ng/g), medium (7.5 and 3.75 ng/g) and high (40 and 20 ng/g). Irinotecan and SN-38 lower limit of quantification were 0.5 and 0.25 ng/g.

Data analysis

Since each animal provided only one sample of blood, data from animals of the same group were pooled using a naïve averaging data approach [11].

Data were analyzed separately for each treatment, giving the average concentration value of plasma and tumor. The non-compartmental analysis was performed using WinNonline 5.2 software (Pharsight, Mountain View, CA). Plasma and tumor irinotecan and SN-38 concentrations versus time curves were used to determine mean maximum concentration (C_{max}), time to achieve maximum concentration (t_{max}), mean residence time extrapolated to infinity ($MRT_{0-\infty}$), area under the concentration time-curve extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$), area under the first moment curve extrapolated to infinity ($AUMC_{0-\infty}$), terminal half-life ($t_{1/2}$), apparent total body clearance (Cl_{app}), apparent volume of distribution (V_{app}) and trough concentration (C_{last}). Amount of irinotecan and SN-38 in tumor are expressed for 100 mg of tumoral tissue.

The mean areas under the concentration-time curves (AUC) were calculated by the trapezoidal method from 0 to the last concentration-time point. Irinotecan and SN-38 trough concentrations were defined as the last quantifiable concentrations.

Irinotecan and SN-38 maximal and trough concentrations were compared using a Student's t-test with a significant level at 0.05. $AUC_{(0 \rightarrow T_{last})}$ of the two groups (irinotecan or SN-38 + bevacizumab versus irinotecan or SN-38 alone) were compared using Bailer's method [12]; the null hypothesis is rejected if $|Z_{obs}|$ is greater than 1.96. As T_{max} and half-lives are unique values, their variation after bevacizumab pretreatment was described but statistical test could not be carried out.

RESULTS

MTT viability test

The effect of bevacizumab on IGROV1 cell proliferation was quantified with MTT assay to determine the number of viable cells. When IGROV1 are incubated with bevacizumab during a short-time period (2 hour) in serum-supplemented media, no statistically significant difference in cell viability was observed.

A statistically significant decrease in IGROV1 cell number was observed at a concentration of bevacizumab of 10.0 mg/ml ($P<0.001$) in cells with 10% FCS incubated 24 hours with bevacizumab ; in serum-free conditions, there was a significant reduction in IGROV1 cell number at a concentration of bevacizumab of 2.5 mg/ml to 10.0 mg/ml ($P<0.05$).

When bevacizumab is incubated 48 hours with IGROV1 cells, a statistically significant decrease in IGROV1 cell number was observed at a concentration of bevacizumab of 10.0 mg/ml ($P<0.001$) in cells with 10% FCS incubated 48 hours with bevacizumab; in serum-free conditions, there was a significant reduction in IGROV1 cell number at a concentration of bevacizumab of 2.5 mg/ml to 10.0 mg/ml ($P<0.001$). The concentrations of bevacizumab required to induce cell death were higher in serum-containing conditions than in serum-free conditions because VEGF in serum binds to bevacizumab and inactivates it.

Effect of bevacizumab on doxorubicin intracellular accumulation

The modification of P-gp activity by bevacizumab *in vitro* was measured by the intensity of doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1-p and IGROV1-DXR cells when cultured in presence of bevacizumab. Significant dose-dependent increase of doxorubicin uptake in IGROV1- DXR cells was observed when they were incubated with bevacizumab at concentrations of 1.0 mg/ml ($***P<0.001$; n=3) and 5.0 mg/ml ($***P<0.001$; n=3) as compared to IGROV1-DXR cells non treated with bevacizumab control cells. In IGROV1-p cells, a slight increase of doxorubicin uptake by cells was observed with bevacizumab at the concentration of 1.0 mg/ml ($*P<0.05$; n=3) while no difference was observed at 5.0 mg/ml as compared to control cells. Treatment by the P-gp inhibitor, verapamil, at 10 μ M led to a significant increase in doxorubicin uptake in IGROV1-DXR cells and IGROV1-p cells as compared to control cells ($***P<0.001$; n=3). (Figure 1 and table I).

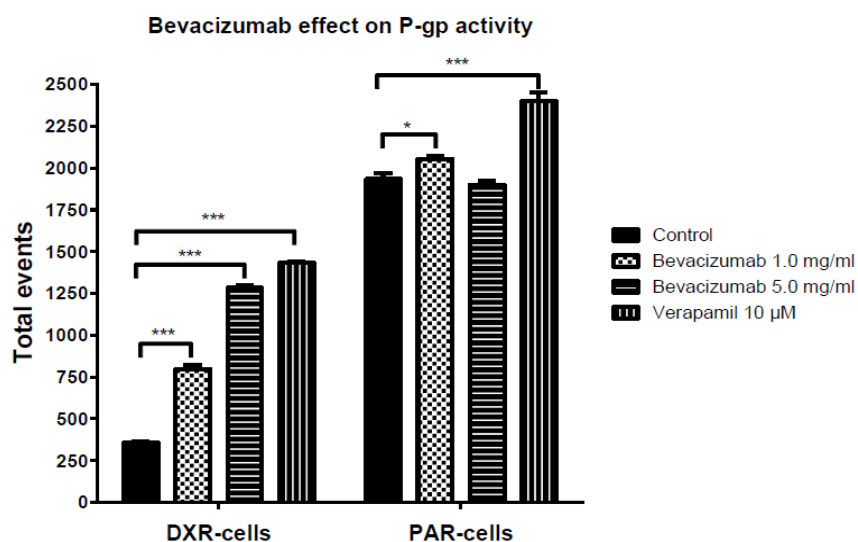


Figure 1: doxorubicin accumulation in IGROV1-DXR cells when cultured in presence of bevacizumab (at 1 and 5mg/ml) (n=3)

*p<0.05; ***p<0.001

Table I: doxorubicin accumulation in IGROV1-DXR cells when cultured in presence of bevacizumab (at 1 and 5mg/ml) (n=3)

	Control	Bevacizumab 1 mg /ml	Bevacizumab 5 mg /ml	Verapamil 10 µM
PAR-cells	1933 ± 62 (n =3)	2054 ± 35*	1900 ± 37	2399 ± 89***
Doxorubicin Acumulation (mean ± SD)		(n =3)	(n = 3)	(n =3)
DXR-cells	357 ± 7 (n =3)	890 ± 74***	1283 ± 24***	1432 ± 19***
Doxorubicin Acumulation (mean ± SD)		(n =3)	(n = 3)	(n =3)

*p<0.05; ***p<0.001

PAR-cells = parental drug-sensitive cell line

DXR-cells = doxorubicin-resistant cell line

Effect of bevacizumab pretreatment on plasma pharmacokinetics parameters of irinotecan and SN-38 in nude mice

On tables II and III are reported plasma pharmacokinetics parameters of irinotecan and of SN-38.

Irinotecan maximum concentration (C_{max}) was observed at $T_{max} = 1$ h after administration. For both groups, bevacizumab did not affect the time required to reach the maximum plasma concentration. Irinotecan AUC was 1.12-fold lower in the bevacizumab-treated mice group; although the difference was not statistically significant. Irinotecan terminal half-life was 1.11-fold longer in bevacizumab-treated mice group, this increase was not statistically significant.

SN-38 C_{max} value was observed at 0.5 h and 0.25 h respectively in the irinotecan alone treated group and in the bevacizumab-pretreated group. SN-38 C_{max} was higher in bevacizumab-pretreated group. Bevacizumab pretreatment affected T_{max} and C_{max} , but not statistically significant. AUC was not modified and terminal half-life was 1.71-fold longer in bevacizumab-treated mice group. Trough concentration of SN-38 was 3.9 times higher in bevacizumab-pretreated group than control group ($p < 0.05$).

Table II: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on plasma pharmacokinetics parameters of irinotecan (40 mg/kg) in nude mice (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	653 $\pm$ 183	660 $\pm$ 199	NS
T_{max} (h)	1	1	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	1716 $\pm$ 162.7	1527 $\pm$ 852.7	NS (Z = 0.46 < 1.96)
Ratio AUC	0.89		
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	6 $\pm$ 0.34	12.3 $\pm$ 4.79	NS
Half-life (h)	1.14	1.26	

Table III: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on plasma pharmacokinetics parameters of SN - 38 after irinotecan (40 mg/kg) administration in nude mice (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	626 $\pm$ 172	844 $\pm$ 175	NS
T_{max} (h)	0.5	0.25	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	1286 $\pm$ 69.8	1257 $\pm$ 120	NS (Z = 0.26 < 1.96)

Ratio AUC	0.98		
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	3.7 ± 1.4	14.5 ± 5.8	S ($p = 0.03 < 0.05$)
Half-life (h)	0.91	1.59	

Bevacizumab administration modifies irinotecan plasma and tumor pharmacokinetic parameters in mice bearing human colorectal carcinoma xenograft :

In plasma

On tables IV and V are reported plasma pharmacokinetic parameters of irinotecan and of SN-38.

Irinotecan T_{max} was observed 1h after its administration in both groups; bevacizumab does not affect the time required for the plasma concentration to reach its maximal values. Interestingly, irinotecan, C_{max} was 2-fold higher in bevacizumab-pretreated mice group, than in control group, this increase was statistically significant ($p = 0.04$). Irinotecan AUC was also 1.74-fold statistically higher in bevacizumab-treated group ($Z_{obs} = 2.54 > Z$ table). Half-life was lower in bevacizumab-pretreated group although not significantly.

SN-38 T_{max} was observed 1h after administration of irinotecan. Regarding SN-38 C_{max} and AUC no statistically significant difference was found between both groups.

Table IV: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on plasma pharmacokinetics parameters of irinotecan (40 mg/kg) in nude mice bearing human colorectal carcinoma (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	855 ± 437	1706 ± 217	S ($p = 0.04 < 0.05$)
T_{max} (h)	1	1	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	1908 ± 415	3323 ± 1218.4	S ($Z = 2.54 > 1.96$)
Ratio AUC	1.74		
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	63.5 ± 58.1	8.4 ± 3.2	NS
Half-life (h)	3.87	0.88	

Table V: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on plasma pharmacokinetics parameters of SN-38 after irinotecan (40 mg/kg) administration in nude mice bearing human colorectal carcinoma (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	596 ± 179	749 ± 472	NS
T_{max} (h)	1	1	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	1109 ± 82.8	1154 ± 102.7	NS ($Z = 0.21 < 1.96$)
Ratio AUC		0.96	
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	14.6 ± 6.8	30.3 ± 19.04	NS
Half-life (h)	2.62	1.35	

In tumor

On tables VI and VII are reported tumor pharmacokinetic parameters of irinotecan and of SN-38.

Irinotecan C_{max} and AUC were 1.3-fold higher in bevacizumab-treated group than in the control. This difference was not statistically significant.

As shown on table V, time necessary to reach the maximal concentration was 1h shorter in the bevacizumab-pretreated mice group with higher C_{max} value, than in the irinotecan alone treated group.

SN-38 C_{max} was observed 4h after administration of irinotecan in the 2 groups but no statistically significant difference was found. Concerning SN-38 AUC in bevacizumab-treated group, it was 1.4 fold higher than in not treated group, this difference was not statistically significant.

Table VI: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on tumor pharmacokinetics parameters of irinotecan (40 mg/kg) in nude mice bearing human colorectal carcinoma (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	1294 $\pm$ 142	1797 $\pm$ 196	NS
T_{max} (h)	2	1	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	5982 $\pm$ 3513.9	7818 $\pm$ 468.8	NS (Z = 1.14 < 1.96)
Ratio AUC	1.31		
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	231.2 $\pm$ 127.5	698.4 $\pm$ 305.6	NS
Half-life (h)	2.18	3.74	

Table VII: Effect of bevacizumab (5 mg/kg) pretreatment on tumor pharmacokinetics parameters of SN-38 after irinotecan (40 mg/kg) administration in nude mice bearing human colorectal carcinoma (noncompartmental analysis).

	Mice received irinotecan alone	Mice received irinotecan and bevacizumab	Probability
C_{max} (ng/mL) $\pm$ SD	252 $\pm$ 155	371 $\pm$ 121	NS
T_{max} (h)	4	4	
AUC (ng*h/mL) $\pm$ SD	1345 $\pm$ 153.5	1868 $\pm$ 224	NS (Z = 1.57 < 1.96)
Ratio AUC	1.39		
Trough concentration (ng/mL) $\pm$ SD	110 $\pm$ 82.8	230.9 $\pm$ 93.6	NS
Half-life (h)	3.34	5.86	

Relationship between plasma and tumor irinotecan concentrations in mice treated by bevacizumab

At each point, irinotecan plasma and tumor mean values of mice treated with irinotecan and bevacizumab were divided by irinotecan plasma and tumor mean values of mice treated with irinotecan alone.

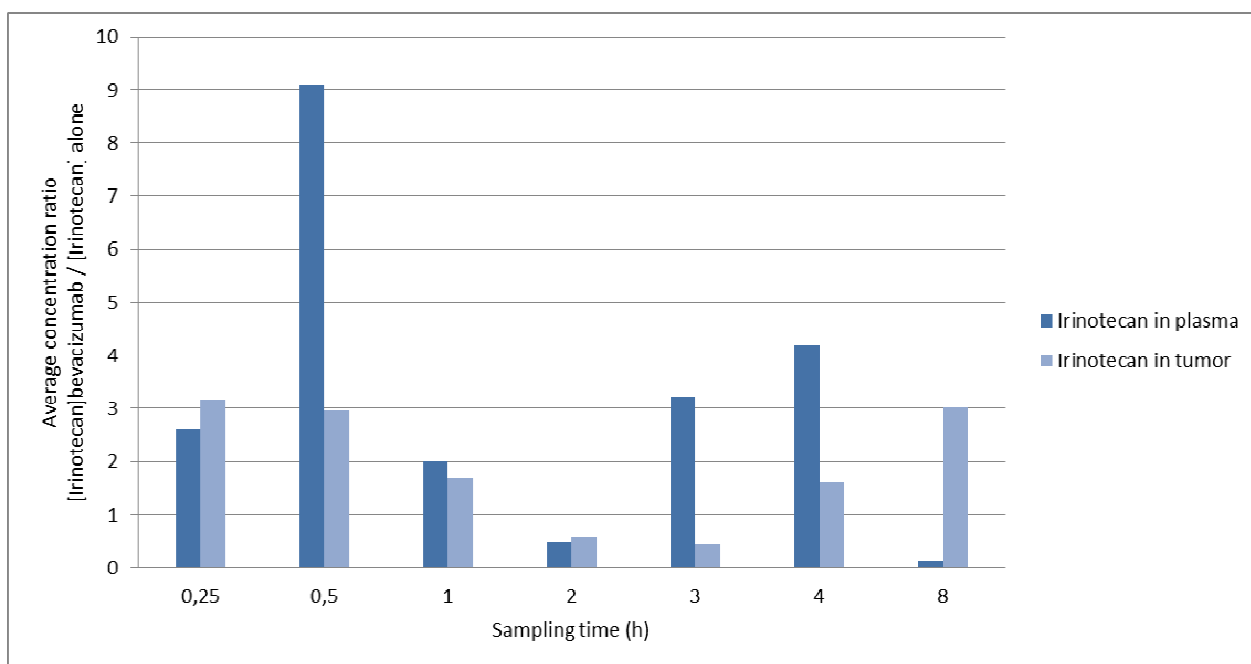


Figure 2 : Mean plasma and tumor concentrations ratios of irinotecan

On figure 2, plasma value ratio of irinotecan increases at 0.5 h after administration of irinotecan and decreases at 8 h and tumor value ratio of irinotecan increase at 8 h after administration of irinotecan.

Relationship between plasma and tumor SN-38 concentrations in mice treated by bevacizumab

SN-38 plasma and tumor mean values of mice treated with irinotecan and bevacizumab were divided by SN-38 plasma and tumor mean values of mice treated with irinotecan alone.

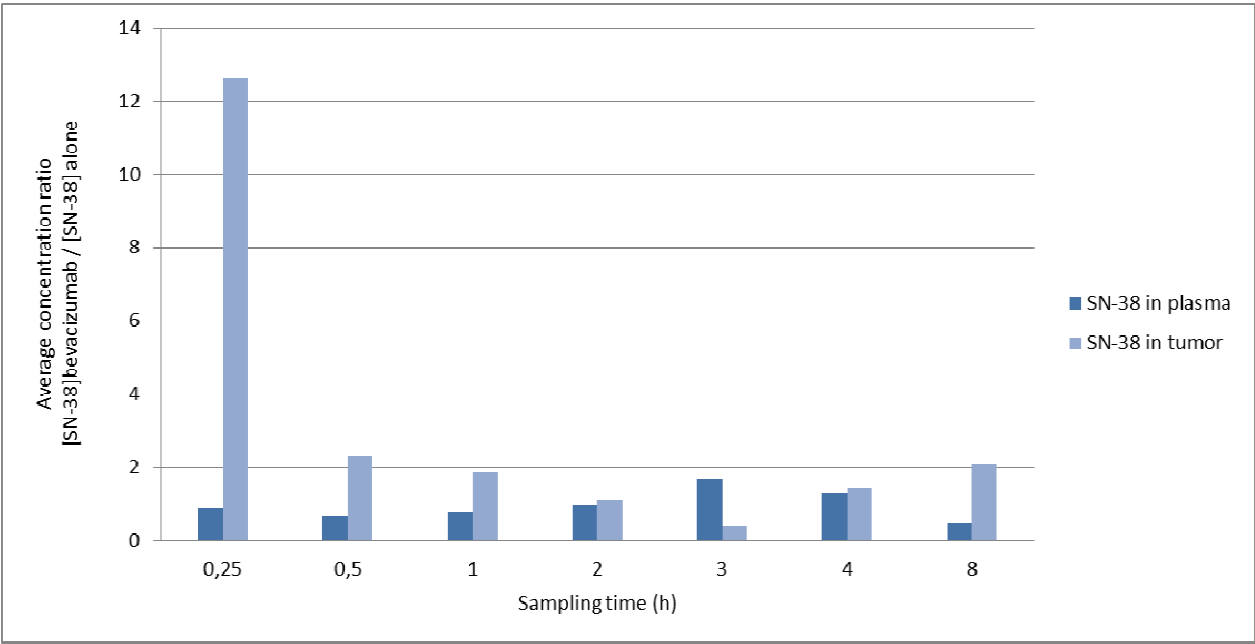


Figure 3 : Mean plasma and tumor concentrations ratios of SN38

As shown on figure 3, higher SN-38 plasma value ratios were observed at two points, 3 and 4 h. Higher SN-38 tumor value ratios were observed at two points, 0.25 and 8 h.

Effect of bevacizumab on irinotecan metabolism into SN-38

SN-38 plasma and tumor mean concentrations were divided by irinotecan plasma and tumor mean concentrations in mice treated or not with bevacizumab. These plasma ratios are shown.

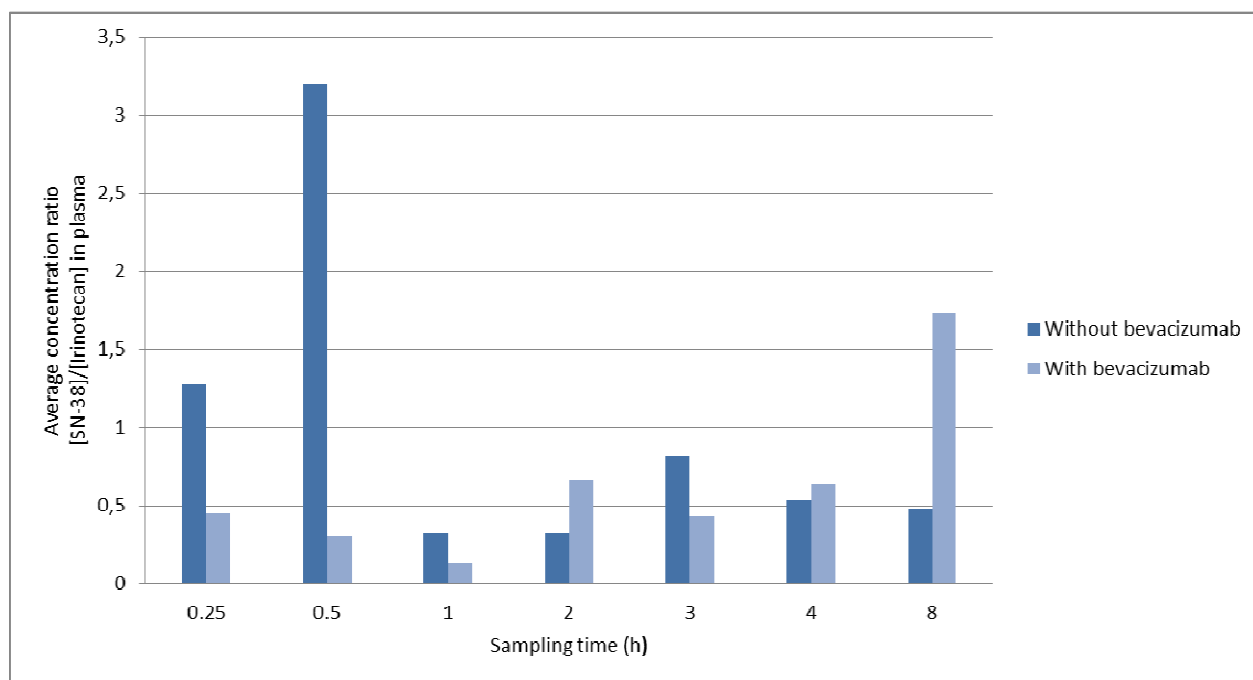


Figure 4: Ratios of SN-38 mean plasma concentrations divided by irinotecan mean plasma concentrations in the absence and presence of bevacizumab.

On figure 4, in plasma, higher SN-38 formation was observed in the absence of bevacizumab in the early sampling times (0.25 and 0.5 h), and their ratios decreased in the late sampling times reflecting higher SN-38 formation in the presence of bevacizumab for the late sampling time (4 h and 8 h).

These tumor ratios are shown.

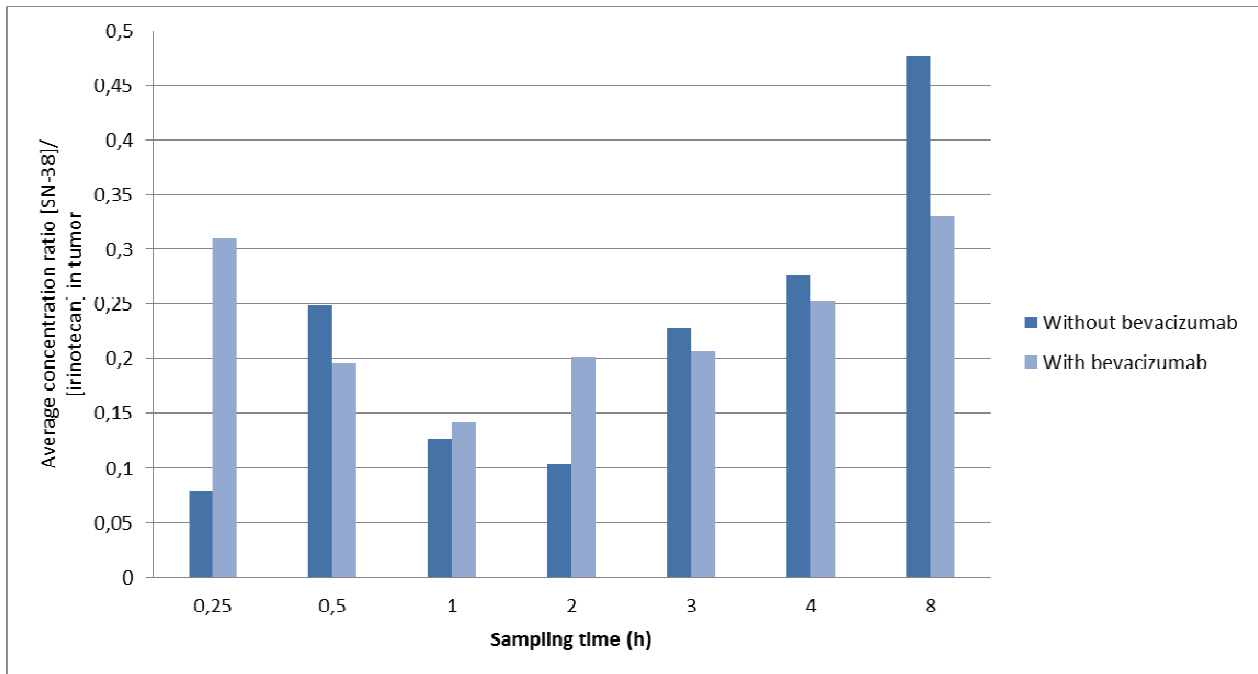


Figure 5 : Ratios of SN-38 mean tumor concentrations divided by irinotecan mean tumor concentrations in the absence and presence of bevacizumab.

On figure 5, In tumor a higher SN-38 formation was observed in the presence of bevacizumab for the times 0.25 h and 2 h in the early sampling times and their ratios were smaller in the later to compared without bevacizumab.

The effect of bevacizumab on SN-38 formation was not constant in plasma and tumor.

DISCUSSION

Chemoresistance is the main limitation to cancer treatment. Resistance to conventional drugs involves ATP binding cassette (ABC) transporters and decreases the efficacy of chemotherapeutics.

Many drugs nowadays have proven their efficiency in the treatment of cancers. However, since there is a correlation between drug level exposure, efficacy and adverse effects [13], it becomes difficult to increase drug posology without increasing side effects risk. It is thus important to study other approaches to increase efficacy by attempting to maintain the drug within the tumor cells it had entered in and by controlling its efflux. This is why it appears interesting in recent protocols to modulate anticancer activity by association with drugs meant to prevent the efflux from the cell to maintain a cellular high concentration.

One of the objectives of this study was to evaluate how a pretreatment with bevacizumab could modify *in vitro* the intracellular increase of doxorubicin concentrations as a modulation of P-gp functionality.

That for we used two cell lines derived from human ovarian carcinoma, the original line IGROV1-p (doxorubicin-sensitive) and the IGROV1-DXR (overexpressing P-gp).

In vitro we observed in IGROV1-DXR cancer cells, a significant increase of intracellular accumulation of doxorubicin (a P-glycoprotein substrate) after pretreatment with bevacizumab. This indicates that resistance to doxorubicin has been attenuated by bevacizumab due to its modulating effect of the functionality of the P-glycoprotein. A similar effect was observed with verapamil (a known inhibitor of P-gp and a positive control in our test). Bevacizumab could directly interact with P-gp and modulates its functionality. A study in breast or lung cancer xenograft bearing nude mice showed that inhibition of the biological activity of VEGF by bevacizumab can improve the absorption and efficacy of co-administered chemotherapy, thus increasing the uptake of paclitaxel (PTX) and causing its higher intra-tumor concentration of paclitaxel, leading to decreased permeability and tumor volume [14]. A case study has reported the resensitization of a paclitaxel-resistant metastatic breast cancer patient to paclitaxel therapy by addition of bevacizumab to his chemotherapy regimen [15].

Furthermore, comparable results have been observed by our team after pretreatment with cetuximab, another monoclonal antibody directly against epidermal growth factor receptor. This could partly explain higher concentration of cytotoxic agents in cancer cells, mainly those that are substrates of P-glycoprotein [16].

We performed *in vivo* a comparative pharmacokinetic study of irinotecan and of SN38 (known to be P-gp substrates [17]) in plasma and in tumors in colorectal tumor graft bearing nude mice, whether or not pretreated with bevacizumab before irinotecan administration.

We observed a significant increase of plasma pharmacokinetic parameters of irinotecan after pretreatment with bevacizumab, in particular the AUC, as well as the $C_{\max}$ which was twice higher in tumor-bearing mice than in not pretreated mice. As it had been shown in previous published studies [18, 19], the modulation of P-gp function will result in an increase of $C_{\max}$, this transmembrane pump is over-expressed in individuals with colorectal cancer cells [20, 21], which potentiates more the expulsion of cytotoxic agents and the decrease of their plasma concentration. This could also explain the lack of statistically significant results in nude mice perhaps because of the lower level of P-gp expression compared to tumor-bearing mice group.

In tumors, we observed a non-significant increase in irinotecan AUC and $C_{\max}$ (1.3 fold) and SN-38 AUC (1.4 fold) after a pretreatment with bevacizumab. Irinotecan AUC tumor increase, although statistically non-significant, can be due to an increase in the distribution into tissues.

Despite the lack of a statistical significant increase, it may be suggested that irinotecan and its active metabolite SN-38 were slightly better distributed in colorectal xenograft in combination with bevacizumab. In addition, $T_{\max}$ reduction may reflect an increase in tumor permeability of irinotecan. This could be explained partly by the modulation of the function of the P-gp by bevacizumab in tumor. Moreover, a study carried out in 2015 [22], on human brain xenograft-bearing mice (Glioblastoma) demonstrated that the pretreatment with bevacizumab could slightly increase the tumor penetration of temozolomide (a minor substrate of P-gp), via a mechanism involving inhibition of P-gp [22].

To document whether bevacizumab may modify irinotecan metabolism through the formation of SN-38, we evaluated the plasma and tumor average concentration ratio of mice treated by irinotecan with or without bevacizumab (figures 4 and 5). This evaluation showed that in plasma the first sampling times, bevacizumab pretreatment led to a decrease in SN-38 formation while it led to its increase in the tumor (0.25 and 2 h).

The results can be explained by the fact that bevacizumab modulates P-gp functionality, facilitating irinotecan diffusion into tissues such as liver and kidneys.

A higher distribution of irinotecan and SN-38 due to bevacizumab led to a second increase of concentrations of both molecules at 4 h sampling time.

The results obtained in this study suggest that irinotecan distribution is the step most affected by the pretreatment with bevacizumab.

Another mechanism was mentioned in the literature referring to increase concentration of combined cytotoxic agents in cancer cells with bevacizumab. Transient compensation of angiogenesis by bevacizumab leads to an increase of vascular permeability and a reduction in tumor edema, an improvement in the distribution of the co-administrated drugs in cancer cells and a cell death increase [23, 24]. In fact, a better induction of apoptosis is suggested due to the administration of bevacizumab with irinotecan, when compared to monotherapy, resulting in cell death increase among malignant tumor cells [25].

A small pharmacokinetic substudy AVF2170g of Phase III clinical trial, suggested that the addition of bevacizumab to the chemotherapy regimen bolus-IFL (irinotecan / 5-FU / leucovorin) in patients with metastatic colorectal cancer did not change plasma concentrations of irinotecan [26], but change the concentrations of SN-38, on average, 33% higher in patients receiving bevacizumab in combination with bolus-IFL, when compared to patients with bolus-IFL alone.

The study performed in 2005 by Gaudreault *et al.* [27], on the effect of bevacizumab on pharmacokinetics of irinotecan, SN-38 and 5-FU in naïve cynomolgus monkeys receiving the Saltz regimen (irinotecan/ 5-FU/leucovorin), concluded that bevacizumab does not influence the pharmacokinetics of the associated drugs. Since this study was conducted on healthy animals, it can be considered that this conclusion is consistent with our findings concerning the lack of a pharmacokinetic interaction between the two drugs in tumor-free mice. Then, it is assumed that the presence of an advanced tumor with a surexpression of P-gp could be a necessary condition for the occurrence of modification of irinotecan and SN-38 pharmacokinetics by bevacizumab.

Nan Qi *et al* [28] have showed in a patient with non-small cell lung cancer that the combined use of paclitaxel (a Pgp substrate) and bevacizumab displayed a rapid distribution of paclitaxel with an increase in its elimination half-life in the pleural fluid. Mean residence time of paclitaxel increased in the presence of bevacizumab. They assumed that this rapid distribution referred to the change in vessel permeability; since the decrease permeability would be beneficial to paclitaxel remaining the target tissues. Our results have shown also an increased half-life elimination of irinotecan and SN38 in tumor in presence of bevacizumab.

CONCLUSION

In addition to its anti-cancer activity, bevacizumab could modulate P-gp functionality and improve the efficacy of P-gp substrates drugs, such as doxorubicin. Bevacizumab significantly increased SN-38 plasma trough concentration in mice and irinotecan AUC and Cmax plasma in mice bearing human colorectal carcinoma. This result could open new research perspectives on the role of monoclonal antibodies in the MDR phenomenon and their association with substrates drugs.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the Cremec consortium that permitted the establishment of the xenograft model CR-IGR016P ('projet C.Re.M.E.C.') and Dr Simone Orbach for her kind help.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The experimental protocol was approved by the Local Animal Experimentation Committee (N°26, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ABBREVIATIONS

P-gp – P-glycoprotein

AUC – area under the curve

C_{max} – maximal concentration

T_{max} – time to reach maximal concentration

t_{1/2} – terminal half-life

CRC – colorectal cancer

MDR – Multidrug Resistance

VEGF – vascular Endothelial Growth Factor

PTX – Paclitaxel

DXR – Doxorubicin Resistant

REFERENCES

- [1] Te Velde EA., Vogten JM., Gebbink MF., *et al.* Enhanced antitumor efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg.* (2002) 89 1302-1309.
- [2] Emmink BL., Van Houdt WJ., Vries RG., *et al.* Differentiated human colorectal cancer cells protect tumor-initiating cells from irinotecan. *Gastroenterology.* (2011) 141 269-278.
- [3] Chu C., Abbata C., Tandia M., *et al.* Cetuximab increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma and tumor of human colorectal carcinoma-bearing mice. *Fundam Clin Pharmacol.* (2014) 28 652-660.
- [4] Wang F., Chen Y., Huang L. *et al.* Cetuximab enhanced the efficacy of chemotherapeutic agent in ABCB1/P-glycoprotein-overexpressing cancer cells. *Oncotarget* (2015) 6 (38) 40850-40865.
- [5] Li L., Jiang AC., Dong O., *et al.* MDR1/P-gp and VEGF synergistically enhance the invasion of hep-2 cells with multidrug resistance induced by taxol. *Ann Surg Oncol.* 2009 may;16(5):1421-8
- [6] Liang H., Zhang Y., Zhang JD., *et al.* Effects of arsenic trioxide on expressions of vascular endothelial growth factor and P-glycoprotein in multidrug resistant leukemia cell line K562/A02. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* (2007) 5 647–650.
- [7] Broggini-Tenzer A., Sharma A., Nytko K. *et al.* Combines treatment strategies for microtubule stabilizing agent-resistant tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2015) 107(4): dju504
- [8] Bénard J., Da Silva J., De Blois MC. *et al.* 1985. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* 45, 4970-4979.
- [9] Jovelet C. Bénard J, Forestier F *et al.* 2012. Inhibition of P-glycoprotein fonctionnality by vandetanib may reverse cancer cell resistance to doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46(5), 484-491.
- [10] Mosman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 55.
- [11] Burtin P., Mentre F., Van Bree J. *et al.* Sparse sampling for assessment of drug exposure in toxicological studies. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetic.* (1996) 21 105-111
- [12] Bailer AJ. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* (1988) 16 303–309.
- [13] Egron A., Olivier-Abbal P., Gouraud A., *et al.* Preventable and potentially preventable serious adverse reactions induced by oral protein kinase inhibitors through a database of adverse drug reaction reports. *Target Oncol.* (2015) 10 229-234.
- [14] Yanagisawa M., Yorozu K., Kurasawa M., *et al.* Bevacizumab improves the delivery and efficacy of paclitaxel. *Anticancer drugs.* (2010) 21 687–694.
- [15] Ishizuna K., Ninomiya J., Kojima M., *et al.* Paclitaxel-resistant advanced recurrent breast cancer: a case of partial response because of addition of bevacizumab to paclitaxel therapy: a case report. *BMC Res Notes.* (2013);6(1)-254.
- [16] Candeil L., Gourdier I., Peyron D., *et al.* ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer.* (2004) 109 848-854.
- [17] Arimori K., Kuroki N., Hidaka M. *et al.* Effect of Pglycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. *Pharm. Res.* (2003) 20 910–917.
- [18] Bonhomme-Faivre L., Benyamina A., Reynaud M. *et al.* Disposition of Delta tetrahydrocannabinol in CF1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. *Addict. Biol.* (2008) 13
- [19] Kovarick JM., beyer D., Bizot MN, *et al.* Pharmacokinetic interaction between verapamil and everolimus healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2005) 60
- [20] Linn SC., Giaccone G. MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* (1995) 31A 1291-1294.

- [21] Tokunaga Y., Hosogi H., Hoppou T., *et al.* Effects of MDR1/P-glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery. Oncol Rep. (2001) **8** 815-819.
- [22] Goldwirt L., Beccaria K., Carprntier A., *et al* Preclinical impact of bevacizumab on brain and tumor distribution of irinotecan and temozolomide. *J. Neurocol* (2015) 122:273-281
- [23] Ellingson BM., Cloughesy TF., Lai A., *et al.* Quantification of edema reduction using differential quantitative T2 (DQT2) relaxometry mapping in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *J. Neurooncol.* (2012) 106 111–119.
- [24] Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol.* (2011) **5** 117–129.
- [25] Vangestel C., Van de Wiele C., Van Damme N, *et al.* (99mTc (CO)(3) His-annexin A5 micro SPECT demonstrates increased cell death by irinotecan during the vascular normalization window caused by bevacizumab. *J Nucl Med.* (2011) 52 1786-1794.
- [26] Genentech, Inc. Package insert for avastin (bevacizumab). South San Francisco (2007).
- [27] Gaudreault J., Shiu V., Bricarello A., *et al.* Concomitant administration of bevacizumab, irinotecan, 5- fluorouracil, and leucovorin: Nonclinical safety and pharmacokinetics. *Int J Toxicol.* (2005) 24 357–363
- [28] Nan Qi, Fang Li, Xiaosong Lit *al.* Combination use of paclitaxel and avastinenhances treatment effect for the NSCLC patients with malignant pleural effusion. *Medicine* (2016) 95:47.

Discussion :

La chimiorésistance est une des principales limites au traitement du cancer.

L'implication des transporteurs ATP binding cassette (ABC) atténue significativement l'efficacité des médicaments de chimiothérapie.

De nombreux médicaments ont de nos jours, prouvé leur efficacité dans le traitement des cancers. Cependant, avec l'existence d'une corrélation entre les niveaux d'exposition, l'efficacité et les effets indésirables des médicaments [108], il devient difficile d'augmenter la posologie d'un médicament sans augmenter le risque d'effets secondaires. Il est donc important d'étudier d'autres approches pour augmenter l'efficacité en essayant de maintenir le médicament dans la cellule tumorale par le contrôle de son efflux. C'est pourquoi il semble intéressant de moduler l'activité anticancéreuse des médicaments par leur association avec d'autres médicaments destinés à les maintenir à des concentrations élevées dans les cellules tumorales.

L'un des objectifs de cette étude est d'évaluer l'effet d'un prétraitement avec le bévacizumab sur l'augmentation des concentrations intracellulaires de la doxorubicine en lien avec une modulation de la fonctionnalité de la P-gp.

Pour cela, nous avons utilisé deux lignées cellulaires dérivées du carcinome ovarien humain, des cellules parentales IGROV1-p (sensibles à la doxorubicine) et les cellules résistantes à la doxorubicine IGROV1-DXR (surexprimant la P-gp).

In vitro, nous avons observé dans les cellules cancéreuses IGROV1-DXR, une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine après

un prétraitement avec le bévacizumab. Ceci indique que la résistance à la doxorubicine a été atténuée par le bévacizumab grâce à son effet modulateur de la fonctionnalité de la P-gp. Un effet similaire a été observé avec le vérapamil (un inhibiteur connu de la P-gp, contrôle positif de notre test). Le bévacizumab pourrait directement interagir avec la P-gp et moduler sa fonctionnalité. Une étude chez des souris porteuses de greffes de cancer du sein ou de cancer du poumon a montré que l'inhibition de l'activité biologique du VEGF par le bévacizumab pouvait améliorer l'absorption et l'efficacité d'une chimiothérapie co-administrée, et ainsi augmenter l'absorption du paclitaxel (PTX) en induisant une concentration intra-tumorale plus élevée de paclitaxel, conduisant à une diminution de la perméabilité et du volume tumoral [109]. Une étude clinique a rapporté la resensibilisation d'un patient métastatique résistant au paclitaxel en ajoutant le bévacizumab à son traitement de chimiothérapie [110].

En outre, des résultats antérieurs comparables *in vitro* et chez l'animal ont été observés par notre équipe après un prétraitement avec le cetuximab, un autre anticorps monoclonal se liant au récepteur du facteur de croissance épidermique. C'est probablement un mécanisme qui pourrait expliquer en partie une concentration plus élevée de médicaments cytotoxiques dans les cellules cancéreuses, principalement des substrats de la P-gp [111].

Nous avons réalisé *in vivo* chez des souris portant une xénogreffe de cancer colorectal humain, une étude pharmacocinétique comparative de l'irinotécan et du SN38 (connus pour être des substrats de la P-gp [112]) dans le plasma et dans la

tumeur, selon que les souris sont prétraitées ou pas avec le bévacizumab avant l'administration de l'irinotécan.

Nous avons observé une augmentation significative des paramètres pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan après un prétraitement avec le bévacizumab, en particulier l'AUC, ainsi que la Cmax qui était 2 fois plus élevée chez les souris prétraitées que chez les souris non prétraitées et porteuses de tumeurs. Comme cela a été démontré dans les études antérieures publiées [113, 114], la modulation de la fonction de la P-gp entraîne une augmentation de la Cmax et de l'AUC, cette pompe d'efflux transmembranaire est surexprimée dans les cellules cancéreuses colorectales [115, 116], ce qui potentialise d'avantage l'expulsion des agents cytotoxiques et la diminution de leurs concentrations plasmatiques. Cela pourrait également expliquer le manque de résultats statistiquement significatifs chez les souris sans tumeur peut-être en raison d'un niveau plus faible d'expression de la P-gp par rapport au groupe de souris porteuses de tumeurs.

Dans les tumeurs, nous avons observé une augmentation non significative de l'AUC et de la Cmax (1,3 fois) de l'irinotécan et de l'AUC du SN-38 (1,4 fois) après un prétraitement avec le bévacizumab. L'augmentation de l'AUC de l'irinotécan dans la tumeur, bien que statistiquement non significative, peut être due à une augmentation de la distribution dans les tissus. Malgré l'absence d'une augmentation statistiquement significative, il peut être suggéré que l'irinotécan et son métabolite actif SN-38 étaient légèrement mieux distribués dans la xénogreffe colorectale en association avec le bévacizumab. En outre, la réduction de Tmax peut refléter une augmentation de la perméabilité tumorale de l'irinotécan grâce au bévacizumab. Cela

peut s'expliquer aussi par la modulation de la fonctionnalité de la P-gp par le bévacizumab dans la tumeur. De plus, une étude réalisée en 2015 [117], sur des souris porteuses de xénogreffe (Glioblastome) a démontré que le prétraitement avec le bévacizumab pourrait augmenter légèrement la pénétration tumorale du témozolomide (un substrat mineur de la P-gp), par un mécanisme impliquant l'inhibition de la P-gp [118].

Pour vérifier si le bévacizumab pouvait modifier le métabolisme de l'irinotécan avec formation du SN-38, nous avons évalué le taux de concentration plasmatique et tumoral moyen des souris traitées par l'irinotécan avec ou sans bévacizumab (figures 4 et 5). Cette évaluation a montré au niveau plasmatique dans les premiers temps d'échantillonnage, que le prétraitement avec le bévacizumab a entraîné une diminution de la formation du SN-38 tout en conduisant à son augmentation dans la tumeur (0,25 et 2 h).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le bévacizumab module la fonctionnalité de la P-gp, en facilitant la diffusion de l'irinotécan dans des tissus tels que le foie et les reins.

Une distribution plus élevée de l'irinotécan et du SN-38 due au bévacizumab a conduit à une deuxième augmentation des concentrations des deux molécules au bout de 4h.

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que la distribution de l'irinotécan est l'élément le plus touché par le prétraitement avec le bévacizumab.

Un autre mécanisme a été mentionné dans la littérature faisant référence à l'augmentation de la concentration de médicaments cytotoxiques dans les cellules cancéreuses après un prétraitement avec le bévacicumab. La compensation transitoire de l'angiogénèse par le bévacicumab entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et une réduction de l'œdème tumoral, une amélioration de la distribution des médicaments co-administrés dans les cellules cancéreuses et une potentialisation de la mort cellulaire [118, 119]. En fait, une meilleure induction de l'apoptose est suggérée également en raison de l'administration du bévacicumab avec l'irinotécan, par rapport à une monothérapie, entraînant une augmentation de la mort cellulaire dans des cellules tumorales [120].

Une petite étude pharmacocinétique AVF2170g, essai clinique de phase III, a suggéré que l'addition du bévacicumab au traitement de chimiothérapie bolus-IFL (irinotécan / 5-FU / leucovorin) chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique n'a pas changé les concentrations plasmatiques de l'irinotécan [121] mais a modifié les concentrations du SN-38, en moyenne, 33% plus élevées chez les patients recevant le bévacicumab en association avec le bolus-IFL, par rapport aux patients recevant le bolus-IFL seul.

L'étude réalisée en 2005 par Gaudreault et al. [122], sur l'effet du bévacicumab sur la pharmacocinétique de l'irinotécan, du SN-38 et du 5-FU chez les singes cynomolgiques naïfs recevant le schéma de Saltz (irinotécan / 5-FU / leucovorin), a conclu que le bévacicumab n'influence pas la pharmacocinétique des médicaments associés. Comme cette étude a été menée sur des animaux sains, on peut considérer que cette conclusion est cohérente avec nos résultats concernant

l'absence d'interaction pharmacocinétique entre les deux médicaments chez des souris sans tumeur. On suppose ensuite, que la présence d'une tumeur avancée avec une surexpression de la P-gp pourrait être une condition nécessaire pour la modification de la pharmacocinétique de l'irinotécan et du SN-38 par le bévacicumab.

Nan Qi et al [123] ont montré chez un patient avec un cancer du poumon non à petites cellules que l'utilisation de la combinaison du paclitaxel (substrat de la Pgp) et du bévacicumab a entraîné une distribution rapide du paclitaxel avec une augmentation de sa demi-vie d'élimination dans le liquide pleural. Le temps de séjour moyen du paclitaxel a augmenté en présence du bévacicumab. Ils supposent que cette distribution rapide est due à la modification de la perméabilité vasculaire; puisque la diminution de cette perméabilité serait bénéfique pour le paclitaxel restant dans les tissus cibles. Nos résultats ont également montré une augmentation de la demi-vie d'élimination de l'irinotécan et du SN38 dans la tumeur en présence de bévacicumab.

CONCLUSION

En plus de son activité anticancéreuse, le bévacicumab pourrait moduler la fonctionnalité de la P-gp et améliorer l'efficacité des médicaments substrats, telle que la doxorubicine comme nous l'avons montré *in vitro* après 3 jours de prétraitement par le bévacicumab.

Le bévacicumab a significativement augmenté les concentrations plasmatiques du SN-38 chez les souris saines, ainsi que l'AUC et la Cmax plasmatiques de l'irinotécan chez les souris porteuses d'un carcinome colorectal humain. Ce résultat

pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de recherche sur le rôle des anticorps monoclonaux dans le phénomène de MDR et leur association avec des médicaments qui sont des substrats de la P-gp.

Article 3: Bevacizumab and Sorafenib modulate P-glycoprotein function in vitro and Bevacizumab increases in vivo Sorafenib concentrations in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice. Soumis à publication (2017)

Introduction :

Le Sorafénib (NEXAVAR®) est un inhibiteur oral multicible de tyrosine kinase (CRAF, BRAF, V600E BRAF, FLT3 et C-KIT); il inhibe également la vascularisation tumorale (CRAF, VEGF-R1, R2 et R3, PDGFR b). Il est indiqué dans le traitement du CHC au stade avancé, du carcinome rénal avancé après échec d'un traitement antérieur à base d'interféron alfa ou d'interleukine-2 ou chez les patients pour lesquels ces traitements étaient inadéquats [60, 84, 85,]. Il est également indiqué dans le traitement du carcinome thyroïdien progressif, localement avancé ou métastatique différencié.

Cependant le sorafénib est un médicament à forte variabilité pharmacocinétique inter et intra-individuelle [91, 124, 125, 126]. C'est un substrat des transporteurs d'efflux, notamment de la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) et de la P-gp (ABCB 1) [127], avec un risque de sous-exposition aux traitements des patients par ce médicament. Les cellules résistantes au sorafénib et surexprimant la P-gp ont montré une importante capacité métastatique et invasive par rapport aux cellules parentales [128].

M. R. Bani et al [129] ont montré que les cellules endothéliales tumorales (TEC = Tumor Endothelial Cells) peuvent acquérir *in vitro* une résistance aux médicaments. Les TEC exprimant la P-gp (codée par ABCB1) sont d'avantages résistantes aux médicaments de chimiothérapie, surtout aux substrats de transporteur de cassette de liaison à l'ATP (ABC), alors qu'aucune différence pour les autres transporteurs ABC n'a été révélée par rapport à l'endothélium normal. La P-gp est physiologiquement présente dans l'endothélium du cerveau, les testicules et le système vasculaire

placentaire, et fonctionne probablement comme une protection contre les agents toxiques circulants [130]. Dans les vaisseaux intra-tumoraux, cela pourrait contribuer à créer une «barrière sanguine», entravant la délivrance de la chimiothérapie aux cellules néoplasiques. Les TEC montrent une sensibilité moindre à certains médicaments de chimiothérapie par rapport aux cellules de l'endothélium normal. Des preuves croissantes suggèrent que les TEC sont en première ligne de la chimiorésistance tumorale.

L'inhibition de l'activité biologique du VEGF par le bévacizumab, anticorps monoclonal humanisé (immunoglobuline G1) peut améliorer la biodisponibilité et l'activité d'une chimiothérapie co-administrée [131].

L'utilisation du bévacizumab chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique (mCCR) présente des avantages en terme de survie sans progression (SSP) et de survie globale (SG) lorsqu'il est associé en première et en deuxième ligne à une chimiothérapie cytotoxique [132].

J.M. Hubbard et al ont montré qu'un double traitement anti-angiogénique combiné à une thérapie cytotoxique peut fournir une stabilisation prolongée de la maladie chez certains patients atteints d'une tumeur maligne gastro-intestinale avancée [133].

De leur côté Philippe V. et al ont étudié l'Influence du sorafénib et du bévacizumab sur le volume du cancer pancréatique au cours d'une analyse monocentrique et ont observé une diminution statistiquement significative du volume pancréatique lors d'un traitement par l'inhibiteur de la tyrosine kinase, sorafénib et l'inhibiteur de l'angiogenèse bévacizumab [134].

D'autres essais cliniques se sont également intéressés à la combinaison du sorafénib et du bévacizumab dans le traitement des patients atteints de cancer colorectal métastatique [135].

Des études antérieures de notre équipe avaient montré que les anticorps monoclonaux tels que le cétuximab pouvaient moduler l'expression de la glycoprotéine P [103,136].

Puisque le sorafénib est un inhibiteur multikinase ciblant plusieurs sérine / thréonine et tyrosine kinases et incluant tous les récepteurs de VEGF, Raf, PDGFréceptor B et FGF récepteur 1, il a été postulé que la combinaison bévacizumab et sorafénib pourrait constituer un meilleur blocage des voies proangiogéniques et inhiber la résistance au bévacizumab telle que la surexpression de la P-gp dans les cellules endothéliales

Dans le présent travail, nous avons étudié, *in vitro*, les interactions potentielles entre les médicaments anti-angiogéniques (sorafénib et bévacizumab) et les fonctionnalités de la P-gp. Nous avons étudié l'effet du sorafénib et / ou du bévacizumab sur les cellules résistantes à la doxorubicine (IGROV1-DXR) et qui surexpriment la P-gp.

In vivo, nous avons étudié comment un prétraitement avec le bévacizumab pouvait modifier les concentrations plasmatiques du sorafénib chez des souris greffées de cellules de cancer colorectal humain.

Bevacizumab and Sorafenib modulate P-glycoprotein function *in vitro* and Bevacizumab increases *in vivo* Sorafenib plasma concentrations in mice.

Mahamadou Tandia^{ab}, Chadi Abbara^{ac}, Marie-Sophie Noel-Hudson^b, Dora Amor^a, Mélanie Polrot^d, Patrick Gonin^d, Laurence Bonhomme-Faivre^{abe}

^a Laboratory of Pharmacology, Service Pharmacie, Hôpital Paul Brousse AP-HP, 14 avenue Paul-Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, France

^b UPRES EA 4123, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris-Sud XI, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France

^c Department of Pharmacology and Toxicology, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49100 Angers, France

^d Animal and Veterinary Resources, IFR 54, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

^e UMR 935- Inserm Modèles des cellules souches malignes et thérapeutiques, institut André Lwoff, 94800 Villejuif, France

ABSTRACT

Overexpression of P-glycoprotein (P-gp) is associated with multidrug resistance. Since sorafenib (NEXAVAR®) is a P-gp (an efflux protein of ATP-binding cassette family) substrate, we tested whether bevacizumab (AVASTIN®), a monoclonal antibody directed toward VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and sorafenib could modulate P-gp functionality.

In vitro two human ovarian carcinoma cells (IGROV1) overexpressing or weakly expressing P-gp were used. Bevacizumab and sorafenib effects on P-gp functionality were evaluated by measuring doxorubicin intracellular accumulation.

In vivo study was to document whether bevacizumab could modify sorafenib disposition in mice. Therefore, concentrations of sorafenib were determined by HPLC in plasma of mice bearing a human colorectal carcinoma xenograft when sorafenib is given orally (5 mg/kg) on day 4, alone or after a pretreatment with bevacizumab (5 mg/kg IP) on days 1 and 3.

In vitro a significant doxorubicin accumulation and reversion of doxorubicin resistance in P-gp expressing cell lines were observed with bevacizumab or sorafenib pretreatment

In vivo, sorafenib AUC was 1.44 fold significantly higher in bevacizumab pretreated group and Cmax was 1.35 fold higher in bevacizumab-pretreated group. Mean residence time of

sorafenib increased in the presence of bevacizumab, this increase reflects an improvement of sorafenib bioavailability after bevacizumab pretreatment.

We may conclude that bevacizumab pretreatment decreases P-gp functionality and increases doxorubicin intracellular accumulation *in vitro* and sorafenib plasma concentrations *in vivo*.

Keywords: Sorafenib, bevacizumab, P-glycoprotein, pharmacokinetics, ABCB1

*Correspondence and reprints: mahamadou.tandia@aphp.fr

INTRODUCTION

Sorafenib (NEXAVAR®) is an oral multitarget tyrosine kinase inhibitor (CRAF, BRAF, V600E BRAF, FLT3, and C-KIT); it also inhibits tumor vasculature (CRAF, VEGF-R1, R2 and R3, PDGFR b). It is indicated in the treatment of advanced HCC, advanced renal cell carcinoma after failure of previous treatment with interferon alfa or interleukin-2 in patients in whom these therapies were inadequate [1, 2, 3]. It is indicated also in the treatment of progressive, locally advanced or metastatic differentiated thyroid carcinoma.

However sorafenib is a drug with a high inter and intra-individual pharmacokinetic variability [4, 5, 6, 7]. It is the substrate of efflux transporters, breast cancer resistance Protein (BCRP) and P-glycoprotein (ABCB1) [8], with a potential risk of under exposure of patients treated with this drug. Sorafenib-resistant cells showed increased metastatic and invasive ability, with a higher expression of P-glycoprotein (P-gp), compared to that of the parental cells. [9]

M. R. Bani et al [10] showed that tumor endothelial cells (TEC) may acquire drug resistance, a characteristic that is maintained in vitro. There is evidence that TEC are more resistant to chemotherapeutic drugs, substrates of ATP-binding cassette (ABC) transporters. TEC express P-glycoprotein (encoded by ABCB1), while no difference with other ABC transporters was revealed compared to normal endothelia. P-glycoprotein is physiologically present in endothelium of the brain, testis and placental vasculature, likely functioning as protection from circulating toxic agents [11]. In intratumor vessels, they might contribute to create a “bloodtumor barrier”, interfering with the delivery of chemotherapy to neoplastic cells. TEC show reduced sensitivity to some chemotherapeutic drugs compared to normal endothelial cells. Increasing evidence suggests that TEC are the first line of tumor chimioresistance.

Inhibition of VEGF biological activity by bevacizumab, a humanized monoclonal antibody (immunoglobulin G 1) could improve the activity of a co-administrated chemotherapy [12].

The use of bevacizumab to patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) provides progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) advantages when combined with cytotoxic chemotherapy in the first and second line settings [13].

Since sorafenib is a multikinase inhibitor targeting several serine/threonine and tyrosine kinases and including all VEGF-receptors, Raf, PDGF receptor B, and FGF receptor 1, the

J.M. Hubbard *et al* have shown that dual antiangiogenic treatment combined with cytotoxic therapy may provide prolonged disease stabilization for select patients with advanced GI malignancies [14].

Philippe V. et al have studied the clinical influence of sorafenib and bevacizumab on pancreatic cancer volume and have shown that pancreatic volume decreases statistically significantly under treatment with both the multi-tyrosine kinase inhibitor sorafenib and the angiogenesis inhibitor bevacizumab [15].

Several other clinical trials have focused on the combination of sorafenib and bevacizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer [16].

Previous studies from our team have shown that monoclonal antibodies such as cetuximab could modulate expression of P-glycoprotein [17] [18].

Since sorafenib is a multikinase inhibitor targeting several serine/threonine and tyrosine kinases and including all VEGF-receptors, Raf, PDGF receptor B, and FGF receptor 1, the combinaison of bevacizumab and sorafenib might provide a more complete blockade of proangiogenic pathways as well as inhibit mechanisms of bevacizumab resistance like surexpression of P-gp in endothelial cells

In the present work we studied potential interactions between anti-angiogenic drugs (sorafenib, and bevacizumab) and P-gp functionality. We studied the effect of sorafenib and /or bevacizumab on doxorubicin resistant cells (IGROV1-DXR) over expressing P-gp.

In vivo we studied how pretreatment with bevacizumab of human colorectal carcinoma bearing mice modifies plasma sorafenib concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Drugs

Doxorubicin was purchased from Teva (Paris France), verapamil from Abbott (Paris France) bevacizumab (AVASTIN[®]) [25mg/mL] were purchased from Pfizer (Montrouge, France) and Roche Registration Limited (Welwyn Garden City, United Kingdom) laboratories, respectively.

Chemicals

Sorafenib (Nexavar[®]) was purchased from Bayer Pharma[®] (Berlin, Germany), erlotinib (internal standard, IS) was purchased from LC[®] laboratories (Woburn, USA). Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM), foetal calf serum (FCS), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin, streptomycin, zeocin, hygromycin B. were purchased from Gibco Invitrogen (Cergy-Pontoise France). Acetonitrile and methanol (liquid-chromatography grade), tetrabutyl ammonium and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA), Acetic Acid were purchased from VWR BDH Prolabo (Haasrode, Belgium), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin, France) ethyl acetate, acetonitrile and dimethylsulfoxide (DMSO) from VWR[®] (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium acetate was purchased from Sigma[®] (St. Louis, MO, USA). Deionized purified water was prepared in our laboratory using DirectQ UV[®] System (Millipore SAS[®], Molsheim, France).

Cell lines

The IGROV1 cells were obtained from Dr. Bernard (Bernard et al., 1985) at the CNRS 8126 laboratory in Villejuif, France.

Establishment of sensitive and resistant doxorubicin cell lines:

IGROV1-p and IGROV1-DXR

A doxorubicin-resistant cell line (IGROV1-DXR), which overexpressed P-gp, was derived from the parental drug-sensitive cell line (IGROV1-p). IGROV1-p cell line was derived from a stage III human ovarian carcinoma. The characterization of the parental sensitive IGROV1-p has been reported previously [19, 20]. The IGROV1-DXR cells were selected from IGROV1-p cells by continuous exposure of these cells to increasing concentrations of doxorubicin in a gradual step-wise manner, up to 0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for doxorubicin. Cell lines were grown as adherent monolayers supplemented with 10% (v/v) FCS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. IGROV1-DXR cells were maintained in medium supplemented with doxorubicin (0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Doxorubicin accumulation assay measured by flow cytometric analysis FACS

P-gp function assessment.

Cell-based doxorubicin transport assays were performed in IGROV1-p and IGROV1-DXR cell lines. Cells were incubated in DMEM with doxorubicin alone (10 μM) plus 5% FBS during 2 h at 37 °C in order to compare doxorubicin accumulation in the two cell lines. After incubation with doxorubicin, cells were washed twice with PBS and dissociated with 0.05% Trypsin-EDTA buffer. Cells were re-suspended in DMEM plus 10% FCS then centrifuged. After washing three times with PBS to eliminate extracellular doxorubicin, fluorescence due to doxorubicin intracellular accumulation was measured by flow cytometry analysis (acquisition of data for 10,000 cells in channel 2)

Effect of bevacizumab on P-gp function in IGROV1-DXR lines.

Effect of bevacizumab was tested at 2 different concentrations (1 mg/ml and 5mg/ml) co-incubated in DMEM with doxorubicin 10 μM and 5% FCS during 2 h at 37°C. Bevacizumab effect was also tested on IGROV1-p cells. Verapamil was used during doxorubicin incubation

as a positive control. P-gp function assessed by doxorubicin accumulation was expressed as percentage of doxorubicin accumulation through the following equation:

$$100 \times (\text{MFI bevacizumab} - \text{MFI control}) / \text{MFI control}.$$

Effect of sorafenib on P-gp function in IGROV1-DXR lines.

Effect of sorafenib was tested at 2 different concentrations (5 mg/ml and 10 mg/ml) co-incubated in DMEM with doxorubicin 10 μM and 5% FCS during 2 h at 37°C. Sorafenib effect was also tested on IGROV1-p cells. Verapamil was used during doxorubicin incubation as a positive control. P-gp function assessed by doxorubicin accumulation was expressed as percentage of doxorubicin accumulation through the following equation:

$$100 \times (\text{MFI sorafenib} - \text{MFI control}) / \text{MFI control}.$$

Human colorectal carcinoma bearing mice

In this study, was used a xenograft model originating from a human tumour collection, established under the CReMEC projet: the CR-IGRO16P primary xenograft. The patient, from whom the tumour originated, was a woman, with an adenocarcinoma of the sigmoid colon with ovarian metastases. The sample was directly derived from the primary tumour.

The CR-IGRO16P tissue was cut into small pieces. These tissues were subcutaneously implanted into Female Foxn1nu CD-1 nude mice flanks. These mice were purchased from Animal and Veterinary Resources, Institut Gustave Roussy, IFR54 (Villejuif, France). Mice were housed under standard laboratory sterile conditions, with sterile water and regular sterile (gamma-irradiated) chow provided ad libitum in a 12-h/12-h light/dark cycle at a 21-23°C temperature. Anesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane in air. When the tumour had reached 2-3 cm in diameter, it was sampled and cut into small pieces to obtain the second-passage model, which was used in the study.

Sorafenib pharmacokinetic studies

Six weeks old male nude mice (20–30 g) were purchased from Animal and Veterinary Resources of Gustave Roussy Institut (IGR Villejuif, France). Mice were randomized into two groups of 21 mice each. The first group received orally sorafenib at the dose of 5 mg/kg. The

second group was pre-treated intraperitoneally with bevacizumab at the dose of 5 mg/kg on days 1 and 3 and one hour later received orally sorafenib at 5 mg/kg.

Three mice randomly chosen were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation, their blood was collected by cardiac puncture in heparinized tubes at 0.5, 1, 2, 3, 6 and 16 h after sorafenib administration. After centrifugation at 3,000 rpm for 5 minutes at 4°C, plasma was transferred to propylene tubes and stored at -20°C until assays.

The animals were treated in accordance with the European Committee standards concerning the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by Local Animal Experimentation Committee (N°26, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

Sorafenib quantification in plasma

Sorafenib concentrations were measured by a HPLC method coupled with UV-visible detector validated according to the recommendations for bioanalytical method validation [21].

We used Shimadzu® chromatography system with UV detector and Labsolutions® chromatography workstation (Shimadzu Corporation®, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was achieved on a C18 ultrasphere ODS® column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex®, Pecq, France) associated with a guard column packed with the same phase.

The calibration was linear in the range of 50-700 ng/mL. The accuracy, within-assay and between-assay precision of the method was 96.9-104.0%, 3.4-6.2% and 7.6-9.9%, respectively. Three sorafenib quality controls were prepared in drug-free plasma: low (50 ng/mL), medium (300 ng/mL) and high (500 ng/mL). The composition of the mobile phase was 40% ammonium acetate (20 mM) and 60% acetonitrile, delivered at a flow rate of 1.2 mL/min.

Data analysis

Data were analysed separately for each mouse group, average concentration at each sampling time was used. A non-compartmental analysis was performed using WINNONLINE professional version 5.2 software (Pharsight, Mountain View, CA, USA). The mean maximum concentrations (C_{max}) and the times necessary to reach it (T_{max}) were evaluated from experimental curves. Terminal half-lives (t_{1/2}) were calculated from the respective

terminal rate constants (K_e), estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the mean concentration vs time curve, by linear regression analysis. The mean areas under the concentration–time curves (AUC) were calculated by the trapezoidal method from 0 to the last concentration–time point. AUC of the two groups were compared using Bailer’s method [22].

Statistical significance was set at $p < 0.05$. Results are expressed as mean $\pm$ standard error to mean (SEM). Under the null hypothesis which indicates that mean AUC are equal, this statistics follows a normal distribution. The null hypothesis is rejected if $|Z_{obs}|$ is greater than 1.96.

RESULTATS

In vitro study

Effect of sorafenib on doxorubicin intracellular accumulation

Decrease of P-gp activity by sorafenib was measured by the amount of doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1-p and IGROV1-DXR when cultured in presence of sorafenib. Significant dose-dependent increase of doxorubicin uptake in IGROV1- DXR cells was observed when sorafenib was added to the culture at concentrations of 5.0 μM (* P <0.05; $n=3$) and 10.0 μM (** P <0.01; $n=3$) as compared to IGROV1-DXR cells not treated with sorafenib (control cells). In IGROV1-p cells, a non statistically significant increase of doxorubicin uptake by cells was observed with sorafenib at the concentration of 10.0 mg/ml as compared to control cells. Treatment by the P-gp inhibitor, verapamil, at 10 μM led to a significant increase in doxorubicin uptake in IGROV1-DXR cells as compared to control cells (** P <0.01; $n=3$) (table 1, figure1).

Effect of bevacizumab on doxorubicin intracellular accumulation

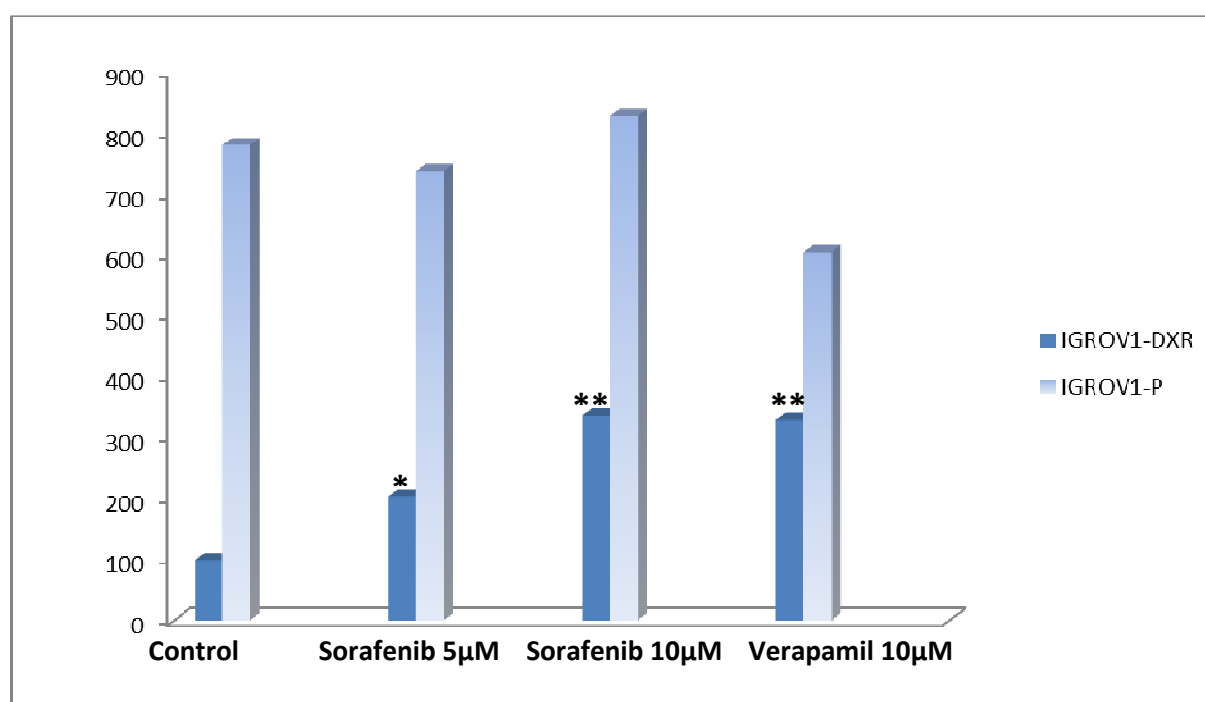
The modification of P-gp activity by bevacizumab *in vitro* was measured by the intensity of doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1-p and IGROV1-DXR when cultured in presence of bevacizumab. Significant dose-dependent increase of doxorubicin uptake in IGROV1- DXR cells was observed when they are incubated with bevacizumab at concentrations of 1.0 μM (** P <0.01; $n=3$) and 5.0 μM (** P <0.01; $n=3$) as compared to IGROV1-DXR cells no treated with bevacizumab control cells. In IGROV1-p cells, a non statistically significant increase of doxorubicin uptake by cells was observed with bevacizumab as compared to control cells. Treatment by the P-gp inhibitor, verapamil, at 10 μM led to a significant increase in doxorubicin uptake in IGROV1-DXR cells as compared to control cells (** P <0.01; $n=3$) (table 2, figure 2).

Table 1: sorafenib pretreatment effect on doxorubicin intracellular accumulation in parental or doxorubicin resistant IGROV1 cells

Doxorubicin concentration μM (Mean $\pm$ SD)	control	Sorafenib 5 μM	Sorafenib 10 μM	verapamil 10 μM
IGROV1-DXR	99 $\pm$ 3	204 $\pm$ 3*	336 $\pm$ 18**	329 $\pm$ 49**
IGROV1-P	780 $\pm$ 14	738 $\pm$ 14	827 $\pm$ 21	604 $\pm$ 41

* p < 0.05 ; **p < 0.01

Figure 1: Doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1- DXR and IGROV1-P cells after preteatment with sorafenib (n=3)



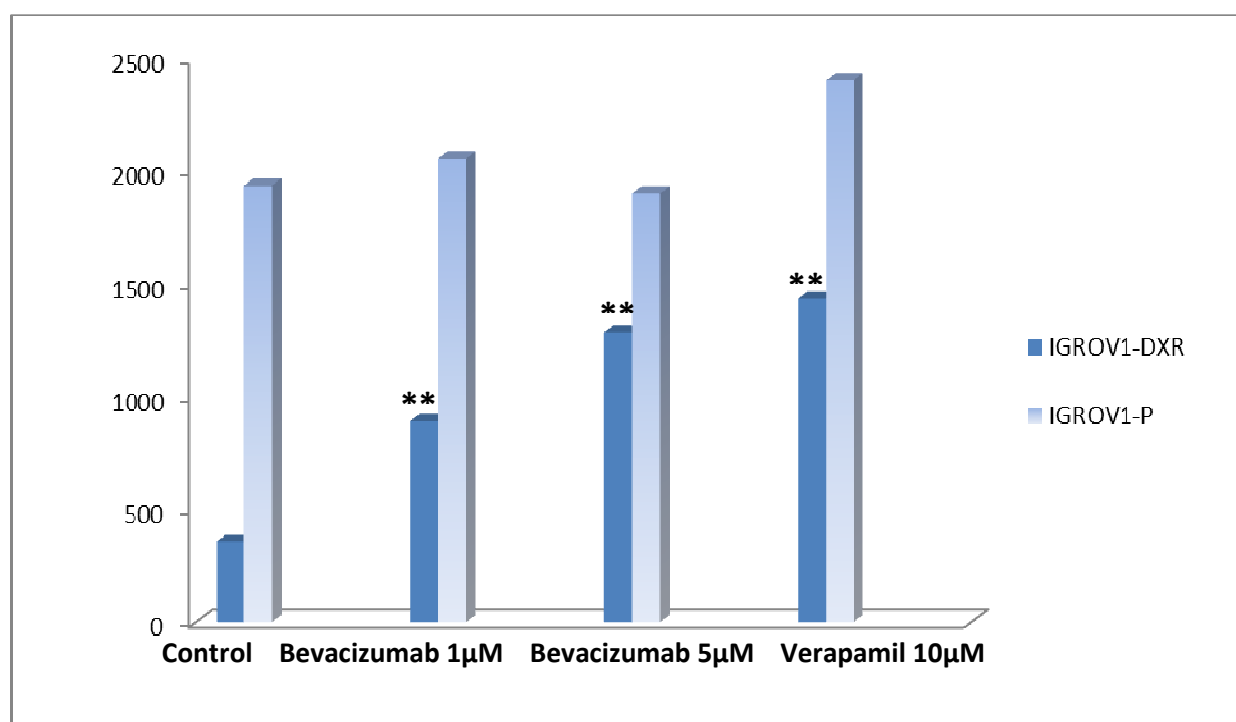
* p < 0.05 ; **p < 0.01

Table 2: Bevacizumab pretreatment effect on doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1 parental or doxorubicin resistant cells

Doxorubicin concentration μM (Mean $\pm$ SD)	control	Bevacizumab 1 μM	Bevacizumab 5 μM	Verapamil 10 μM
IGROV1-DXR	357 $\pm$ 7	890 $\pm$ 74**	1283 $\pm$ 24**	1432 $\pm$ 19**
IGROV1-P	1933 $\pm$ 62	2054 $\pm$ 35	1900 $\pm$ 37	2399 $\pm$ 89

**p < 0.01

Figure 2: Doxorubicin intracellular accumulation in IGROV1- DXR and IGROV1-P cells after preteatment with bevacizumab (n=3)



* p < 0.05 ; **p < 0.01

Effect of bevacizumab pretreatment on plasma pharmacokinetic parameters of sorafenib in mice bearing human colorectal carcinoma xenograft

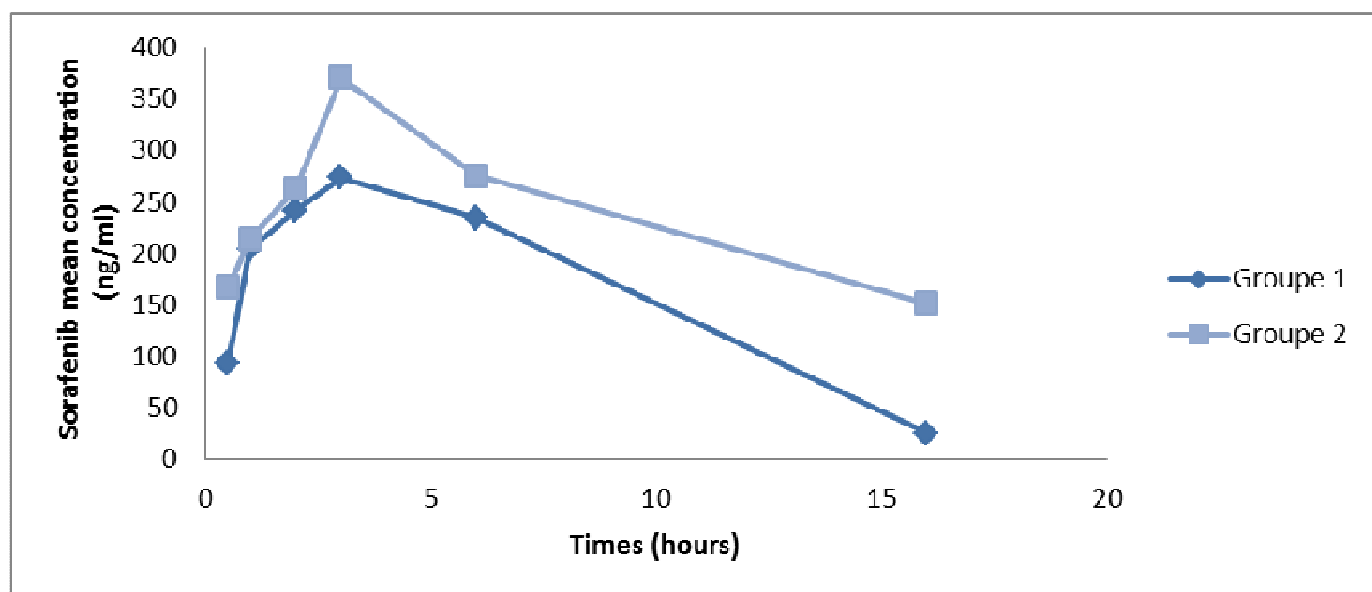
The mean plasma concentrations of sorafenib are reported in table 3 and figure 3, they represent the sorafenib plasma concentrations versus time curves. Using a noncompartmental analysis, plasma pharmacokinetic parameters of sorafenib were calculated (table II). In both non pretreated and bevacizumab pretreated groups, T_{max} was observed 3 hours after sorafenib administration, bevacizumab pretreatment does not affect the time required to reach the maximal plasma concentration of sorafenib. Sorafenib AUC was 1.44-fold higher in bevacizumab-treated group ($Z_{obs} = 2.86 > Z_{table}$), this difference was statistically significant. C_{max} was 1.35 - fold higher in bevacizumab-pretreated mice group, but this increase was not statistically significant. Half-life and MRT were respectively 2.91- and 2.71 - fold higher in pretreated group.

Table 3: Plasma pharmacokinetic parameters of sorafenib after oral administration (5 mg/kg) in nude mice bearing human colorectal carcinoma and which received or not bevacizumab (5 mg/kg). A noncompartmental analysis.

	Mice that received only sorafenib	Mice that received sorafenib after bevacizumab pretreatment	Probability
C _{max} (ng/ml)	273.91 ± 55.19	370.56 ± 104.75	p=0.23 (NS)
AUC 0-16h (h*ng/ml)	2640.32 ± 168.51	3795.00 ± 366.75	Z obs = 2.86>1.97 (S)
C last (ng/ml)	< LOQ	151.16 ± 3.59	
T max (h)	3	3	
t 1/2 (h)	3.57	10.39	
MRT (h)	5.84	15.84	

C_{max}, mean maximal concentrations compared by student test; AUC 0-16h, Area under the curve calculated by trapezoidal method from time 0 to time 16h and compared by Bailer's method; T_{max}, time to reach the maximal concentration; C last, lowest measured concentration; T 1/2, elimination half life time ; MRT, Mean Residence Time ; NS, not significant.

Figure 3: Mean plasma concentration-time curve of sorafenib in the absence and in the presence of bevacizumab.



Groupe1: after oral administration of sorafenib (5 mg/ kg)

Groupe2: after oral administration of sorafenib (5 mg/ kg) after pretreatment with bevacizumab (5 mg/ kg)

DISCUSSION:

The efflux of anticancer drugs from tumor cells during treatment is one of the causes of treatment failure. The expression of P-gp in the small intestine, liver and kidneys may be responsible for changes in the pharmacokinetics of P-gp-mediated drugs and then for the failure of treatment [23]. To avoid this, several P-gp inhibitors have been tested, but their use is not approved in clinical practice because of drug interactions and side effects [24].

In vitro, we observed in IGROV1-DXR cancer cells, a significant increase in the intracellular accumulation of doxorubicin in a dose dependent manner after pretreatment with bevacizumab or sorafenib. This indicates that resistance to doxorubicin was attenuated by pretreatment with either drug, due to their modulating effect of the functionality of P-gp, an efflux pump for doxorubicin. A similar effect was observed with verapamil (a known P-gp inhibitor and positive control of our test). Bevacizumab could directly interact with P-gp and modulate its functionality.

Huang *et al.* have shown that expression of MDR1 was significantly decreased after sorafenib treatment in a human gastric cancer cell line SGC7901/DDP and may reverse resistance to cisplatin through down-regulating MDR1 expression [25].

Wei L. *et al.* have explored the role of sorafenib in reversing MDR in hepatoma cells and have equally showed that sorafenib partially reversed the drug resistance of BEL-7402/FU cells to adriamycin [26].

M.R. Bani *et al.* have also shown that exposure of ovarian adenocarcinoma tumor endothelial cells to sorafenib abrogates resistance to doxorubicin and paclitaxel *in vitro*, increasing drug accumulation with no beneficial effect to cytotoxic drugs that are not P-glycoprotein substrate [10].

J. Dong *et al.* [9] have shown that sorafenib exerts potent inhibitory activity against epithelial-mesenchymal transition (EMT) and multidrug resistance (MDR) by inhibiting mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in HCC. However, after long-term exposure to sorafenib, HCC cells exhibit EMT and resistance to sorafenib.

In our previous studies, we have shown that cetuximab antibody directly against EGFR can interact with P-gp and inhibit its functionality, leading to increased intracellular accumulation of doxorubicin (a P-gp substrate) in cancer cells that are over-expressing P-gp [17]. Molecular modeling of P-gp cetuximab interactions showed that cetuximab is able to bind P-gp extracellular part [18]. The *in silico* molecular modeling of the P-gp cetuximab interactions shows that the antibody binds to the extracellular part of the transmembrane protein through its complementarily determining region, especially with its L3, H2 and H3 chains, as it is frequently observed in peptide-antibody complexes.

A meta-analysis of four studies concluded that the addition of bevacizumab to chemotherapy offers meaningful improvement in progression-free survival (PFS) and objective response rate (ORR) in ovarian cancer treatment [27].

Since sorafenib is a known substrate of P-gp, we suspected that bevacizumab could increase its concentration *in vivo*.

In our work we performed a pharmacokinetic study of sorafenib after oral administration, with or without pretreatment by bevacizumab, in plasma of mice bearing a human colorectal cancer xenograft and compared the results of both groups. T_{max} was 3 hours in both groups (pre-treated or not by bevacizumab), similar to T_{max} reported in PK studies in mice [28, 29]. We observed a non-significant increase in C_{max} in the pretreated group with bevacizumab, but a significant increase in sorafenib AUC in plasma. The half-life and MRT were higher in the pretreated group with bevacizumab. These results indicate that pretreatment with bevacizumab increases plasma concentrations and exposure to the drug.

The increase of C_{max} indicates an effect on the intestinal absorption of sorafenib, the variation of which is not significant, probably due to the high bioavailability of sorafenib which could reach 80% in mice. The elimination of sorafenib is mainly biliary. In fact, the increase in the half-life of sorafenib and the MRT are signs of decreased elimination, probably due to inhibition elimination bile duct of P-gp [29].

CONCLUSION:

Bevacizumab and sorafenib, two anti-angiogenic drugs could sensitize tumor cells to chemotherapies by modulating P-glycoprotein functionalities like we shown in vitro with a beneficial effect when these drugs are combined.

Inhibition of P-glycoprotein functionality by bevacizumab could restore thus chemosensitivity and increase plasma concentration of sorafenib, probably due to a P-glycoprotein pharmacological dependent interaction.

The anti-angiogenic activity of these two drugs might also be potentiated by the modulation of P-glycoprotein functionalities that could sensitize tumor endothelial cells to cytotoxic agents.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the Cremec consortium that permitted the establishment of the xenograft model CR-IGR016P ('projet C.Re.M.E.C.') and Dr Simone Orbach for her kind help.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The experimental protocol was approved by the Local Animal Experimentation Committee (N°26, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ABBREVIATIONS

P-gp – P-glycoprotein
AUC – area under the curve
 $C_{\max}$ – maximal concentration
 $T_{\max}$ – time to reach maximal concentration
 $t_{1/2}$ – terminal half-life
CRC – colorectal cancer
MDR – Multidrug Resistance
VEGF – vascular Endothelial Growth Factor
PTX – Paclitaxel
DXR – Doxorubicin Resistant

References

1. Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Raoul J, Zeuzen S et al. Sorafenib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma, (HCC): results of a phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). *J Clin Oncol*. 2007; 18S (25).
2. European Medicines Agency (EMA), NEXAVAR: EPAR - Scientific Discussion, 2007, [Internet], Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000690/WC500027707.pdf [Consulted 12 May 2015].
3. Monograph of sorafenib. VIDAL Ed. 2017.
4. Pascaline Boudou-Rouquette, Stanislas Ropert, Olivier Mir, Romain Coriat, Bertrand Billemonet, Michel Tod, et al. *Variability of Sorafénib Toxicity and Exposure over Time: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis*. *The Oncologist Express*. 2012; 17:1204-1212.
5. Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M, Gurney H. *Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies*. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 10; 30(32): 4017-25.
6. Di Marco V, De Vita F, Koskinas J, Semela D, Toniutto P, Verslype C. *Sorafenib: from literature to clinical practice*. *Ann Oncol*. 2013 Apr; 24 Suppl 2:ii30-ii37.
7. M. Tandia, A. Mhiri, B. Paule, R. Saffroy, V. Cailliez, G Noé, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of Pglycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Apr; 79(4):759 – 766.
8. Jurjen S. Lagas , Robert A.B. van Waterschoot, Rolf W. Sparidans, Jos H. Beijnen and Alfred H. Schinkel. *Breast Cancer Resistance Protein and P-glycoprotein Limit Sorafenib Brain Accumulation*. *Mol Cancer Ther* February 2010 9; 319-326.
9. Dong J, Zhai B, Sun W, Hu F, Cheng H, Xu J Activation of phosphatidylinositol 3- kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi- drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*. 2017; 12(9): e0185088.
10. Maria Rosa Bani ; Alessandra Decio; Raffaella Giavazzi; Carmen Ghilardi.. Contribution of tumor endothelial cells to drug resistance: anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors act as p-glycoprotein antagonists *Angiogenesis* (2017) 20:233–241DOI 10.1007/s10456-017-9549-6
11. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:361–398. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
12. Ellingson B.M., Cloughesy T.F., Lai A., et al. Quantification of edema reduction using differential quantitative T2 (DQT2) relaxometry mapping in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *J. Neurooncol*. (2012) 106 111–119.
13. Hyun Joo Jang, Bum Jun Kim, Jung Han Kim, Hyeong Su Kim. The addition of bevacizumab in the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: an updated meta-analysis of randomized trials. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 42), pp: 73009-73016.
14. Joleen M. Hubbard, George Kim, Mitesh J. Borad, Elizabeth Johnson, Rui Qin, Janet Lensing, Suneetha Puttabassavaiah, John Wright, Charles Erlichman and Axel Grothey. Phase I trial of FOLFIRI in

combinaison with sorafenib and bevacizumab in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Invest New Drugs*. 2016 February; 34(1): 96-103.

15. Philippe V, Zahel T, Bärthel K, Rasch S, Ebert O, Schmid RM, Rummeny E, Algül H. Influence of Sorafenib and Bevacizumab on pancreatic volume – A monocentric CT based analysis. *Pancreatol*. 2016 jul-Aug; 16(4):621-624.
16. Alliance for clinical trials in oncology. Sorafenib and bevacizumab in treating patients with metastatic colorectal cancer. *Clinicaltrials.gov*. august 2017.
17. Chu C. , Abbata C., Tandia M., et al. Cetuximab increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma and tumour of human colorectal carcinoma-bearing mice. *Fundam Clin Pharmacol*. (2014) 28 652-660.
18. C. Chu, M.S. Noël-Hudson, J. Bénard, T. Ha-Duong, F. Allaoui, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre. Cetuximab directly inhibits P-glycoprotein function in vitro independently of EGFR binding. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 76 (2015) 18–26.
19. Bénard J., Da Silva J., De Blois MC. *et al.* 1985. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res*. 45, 4970-4979.
20. Jovelet C. Bénard J, Forestier F *et al.* 2012. Inhibition of P-glycoprotein functionality by vandetanib may reverse cancer cell resistance to doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46(5), 484-491.
21. Blanchet B, Billemont B, Cramard J, Benichou AS, Chhun S, Harcouet L, et al. Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *J Pharm Biomed Anal*. 2009 May 1;49(4):1109-14. PubMed PMID: 19278805.
22. Bailer AJ. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. (1988) 16 303–309.
23. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):4028-33.
24. Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Jun;32(1-2):211-27.
25. Huang YS, Xue Z, Zhang H. Sorafenib reverses resistance of gastric cancer to treatment by cisplatin through down-regulating MDR1 expression. *Med Oncol*. 2015 Feb;32(2):470 doi: 10.1007/s12032-014-0470-1.
26. Wei L, Huang N, Yang I et al. Sorafenib reverses multidrug resistance of hepatoma cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009 May; 29(5):1016-9, 1023.
27. Ye Q, Chen H-L: Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer: a meta-analysis from four phases III randomized controlled trials. *Arch Gynecol Obstet* 2013, 288:655–666.
28. Pawaskar DK, Straubinger RM, Fetterly GJ, Hylander BH, Repasky EA, Ma WW, et al. Physiologically based pharmacokinetic models for everolimus and sorafenib in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 May;71(5):1219-29.
29. Saber-Mahloogi HM, DE. . Pharmacology review-Sorafenib. Center for Drug Evaluation and Research; Rockville- FDA. 2005. NDA 21,923.

DISCUSSION :

L'efflux des médicaments anticancéreux hors des cellules tumorales est l'une des causes de l'échec du traitement. L'expression de la P-gp dans l'intestin grêle, le foie et les reins peut être responsable des modifications de la pharmacocinétique des médicaments-sustrats de la P-gp et également de l'échec thérapeutique [137].

Pour l'éviter, de nombreux inhibiteurs de la P-gp ont été testés, mais malheureusement leur utilisation n'est pas approuvée dans la pratique clinique en raison d'interactions médicamenteuses et d'effets secondaires [138].

In vitro, nous avons observé dans des cellules cancéreuses IGROV1-DXR une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine de manière dépendante à la dose utilisée pour le prétraitement avec le bévacicumab ou le sorafénib. Ceci indique que la résistance à la doxorubicine a été atténuée suite à un prétraitement avec ces deux médicaments, en raison de leur effet modulateur sur la fonctionnalité de la P-gp, transporteur d'efflux de la doxorubicine. Un effet similaire a été observé avec le vérapamil (inhibiteur connu de la P-gp et contrôle positif de notre test). Le bévacicumab pourrait directement interagir avec la P-gp et moduler sa fonctionnalité.

Huang *et al.* ont montré que l'expression de MDR1 a été considérablement diminuée après un traitement par le sorafénib des cellules de cancer gastrique humain SGC7901 / DDP et peut reverser la résistance au cisplatine de l'expression de MDR1 [139].

Wei L.*et al.* ont exploré le rôle du sorafénib dans la réversion à travers la régulation de MDR dans les cellules de l'hépatome et ont également montré que le sorafénib a partiellement reversé la résistance des cellules BEL-7402 / FU à l'adriamycine [140].

M.R. Bani *et al.* ont également montré *in vitro* que l'exposition des cellules endothéliales tumorales de l'adénocarcinome ovarien au sorafénib abroge leur résistance à la doxorubicine et au paclitaxel, et augmente l'accumulation du médicament, sans effet bénéfique pour les médicaments cytotoxiques qui ne sont pas substrat de la P-gp [129].

J. Dong et al [128] ont montré que le sorafénib exerce une activité inhibitrice puissante contre la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT = epithelial-mesenchymal transition) et la résistance multiple aux médicaments (MDR) en inhibant la voie de signalisation des MAP kinases dans le CHC. Cependant, après une longue exposition au sorafénib, les cellules du CHC présentent une EMT et une résistance au sorafénib.

Dans nos précédentes études, nous avons montré que le cétuximab, un anticorps monoclonal directement dirigé contre l'EGFR pouvait interagir avec la P-gp et inhiber sa fonctionnalité conduisant à une accumulation intracellulaire de doxorubicine (substrat de la P-gp) dans les cellules cancéreuses qui surexpriment la P-gp [103].

Une modélisation moléculaire des interactions entre la P-gp et le cétuximab a montré que le cétuximab est capable de se lier à la partie extracellulaire de la P-gp [136]. La modélisation moléculaire *in silico* des interactions entre la P-gp et le cétuximab montre que l'anticorps se lie à la partie extracellulaire de la protéine transmembranaire dans la région du complément déterminant, en particulier avec

ses chaînes L3, H2 et H3, comme cela est fréquemment observé dans les complexes peptide-anticorps.

Une méta-analyse de quatre études a conclu que l'ajout du bévacizumab à la chimiothérapie améliore significativement la survie sans progression (PFS) et accroît le taux de réponse objective (ORR) dans le traitement du cancer de l'ovaire [141].

Puisque le sorafénib est un substrat connu de la P-gp, nous avons postulé que le bévacizumab pourrait en augmenter sa concentration *in vivo*.

Dans ce travail, nous avons effectué une étude de pharmacocinétique plasmatique chez des souris portant une xénogreffe de cancer colorectal humain, après une administration orale de sorafénib avec ou sans prétraitement avec le bévacizumab. Le Tmax était de 3 heures dans les deux groupes (prétraités ou non avec bévacizumab), semblable au Tmax rapporté dans des études de PK chez la souris [142, 143]. Nous avons observé une augmentation non significative de la Cmax dans le groupe prétraité avec le bévacizumab, ainsi qu'une augmentation significative de l'AUC du sorafénib. La demi-vie et le MRT étaient plus élevés dans le groupe prétraité avec le bévacizumab. Ces résultats indiquent que le prétraitement avec le bévacizumab augmente les concentrations plasmatiques et l'exposition au médicament.

L'augmentation de la Cmax indique un effet sur l'absorption intestinale du sorafénib, la variation n'est pas significative, probablement en raison de la biodisponibilité élevée du sorafénib qui pourrait atteindre 80% chez la souris. L'élimination du sorafénib est principalement biliaire, en fait, l'augmentation de la demi-vie de

sorafénib et du MRT sont des signes d'une diminution de l'élimination, probablement en raison d'une inhibition de l'élimination biliaire par la P-gp [143].

En conclusion :

Le bévacicumab et le sorafénib, deux médicaments anti-angiogéniques peuvent augmenter la sensibilité de l'endothélium tumoral et des cellules tumorales à des chimiothérapies en modulant la fonctionnalité de la P-gp avec un effet bénéfique de la combinaison de ces médicaments.

La modulation de la fonctionnalité de la P-gp par le bévacicumab pourrait restaurer la chimiosensibilité et augmenter les concentrations plasmatiques du sorafénib en raison probablement de l'interaction pharmacologique dépendante de la P-gp.

CONCLUSION GENERALE

La prise en charge des cancers fait appel à des compétences pluridisciplinaires. Le clinicien pour s'aider dans ses prises de décision face à la variabilité des réponses aux traitements, fait appel au suivi pharmacologique voire pharmacogénétique des patients ainsi qu'aux recommandations nationales et internationales.

Le sorafénib, médicament antiangiogénique utilisé dans le traitement du CHC chez l'homme, subit une grande variabilité pharmacocinétique inter et intra-individuelle.

L'étude de corrélation entre cette variabilité et les polymorphismes génétiques des transporteurs d'efflux (ABCB 1 et ABCG2) n'a pas permis d'établir un lien statistiquement significatif, mais a dégagé une tendance, selon laquelle une meilleure réponse clinique est observée dans le groupe hétérozygote comparativement au groupe homozygote (type sauvage et mutant).

Le concept de l'inhibition des transporteurs d'efflux n'étant pas directement étudié dans la pratique clinique de routine chez l'homme. Nous avons réalisé la suite de nos travaux *in vitro*, sur des modèles de lignées cellulaires du cancer ovarien humain (IGR OV1) et *in vivo* chez des souris nude saines et/ou porteuses de greffes de cancer colorectal humain.

Le prétraitement *in vitro* de cellules IGR OV1 avec des médicaments antiangiogéniques tels que le bévacizumab et le sorafénib, a entraîné une augmentation significative des concentrations intracellulaires de la doxorubicine dans les cellules qui lui sont résistantes et qui surexpriment la P-gp. Cette restauration de

la sensibilité de ces cellules à la doxorubicine est due probablement à la modulation de la fonctionnalité de la P-gp.

Le prétraitement *in vivo* des souris nude xénogreffées de cellules de cancer colorectal humain avec le bévacizumab a entraîné une augmentation significative des concentrations plasmatiques du SN38, de l'AUC et de la Cmax plasmatiques de l'irinotécan ainsi que de l'AUC plasmatique du sorafénib.

Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes, notamment une inhibition ou une variation de la fonctionnalité et / ou des niveaux d'expression de transporteurs d'efflux en particulier la P-gp, une réduction de l'angiogenèse, une restauration de la sensibilité de l'endothélium tumoral et des cellules tumorales avec une variabilité des réponses individuelles aux traitements chez l'homme ou chez la souris.

Cependant l'inhibition des transporteurs d'efflux ou de l'angiogenèse est à l'origine de nombreuses interactions et toxicités médicamenteuses. La recherche d'un équilibre entre l'efficacité, le degré d'inhibition et les seuils d'apparition des interactions médicamenteuses et des effets secondaires, fournira au clinicien un outil efficace d'aide à la prise de décision au profit d'un rapport bénéfice/risque favorable aux patients.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Institut national du cancer. Les cancers en France en 2016 l'essentiel des faits et chiffres. ISBN 978-2 – 37219 - 266-8. ISBN 978-2-37219-266-8. ISBN 978-2-37219-266-8.
2. Marie Bidart, François Berger, Laurent Pelletier. Les thérapies anti-angiogéniques : de la théorie à la pratique. Ann. Biol Clin 2013 ; 71 (5) : 2527-35.
3. *Angiogenesis insights from a systematic overview. New York: Nova Science. 2013. ISBN 978-1-62618-114-4.*
4. I. RUIZ, C. Féray. Prise en charge du carcinoma hépatocellulaire. Cancer/Radiothérapie 2015 ; (19) :410-415.
5. A. Méjean, T. Lebreton ; la cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts, Progrès en Urologie (2008), Suppl. 7, S156–S166.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. N Engl J Med 1971 18 ; 285 : 1182-6.
7. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takanatsu Symp 1991 ; 22 : 339-47.
8. Jary M, Borg C, Bouché O, Kim S, André T, Bennouna J. Traitements anti-angiogéniques dans le cancer colorectal métastatique : peut-on envisager un blocage continu de l'angiogenèse ? Bulletin du cancer. Volume 102, Issue 9, September 2015, Pages 758-771
9. Lucas Treps, Julie Gavard. L'angiogenèse tumorale quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences* 2015 ; 31 : 989-95.
10. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. Science 1999; 284(5422): 1994-8.

11. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249-57.
12. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007;369(9574):1742-57.
13. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94(6):715-25.
14. Carmeliet et al. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011. 473(7347) : 298-307.
15. Byrne AM et al. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J. Cell. Mol.* 2005. 9(4): 777-94.
16. Ferrara N. VEGF-A : a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009. 20(4) : 158—63.
17. Bikkfalvi A. Angiogenèse tumorale. *Bull Cancer*. 2007.94 (suppl. FMC) : F193-8.
18. Ray-Coquard I et al. Traitements anti VEGF : un employ universel ? *Bull Cancer*. 2007. (numéro spécial) : S191-6.
19. Terme M et al. Modulation of immunity by Antiangiogenic Molecules in Cancer. *Clinical and Development immunology*. 2012. AZrticle ID 492920.
20. Voron T et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*. 2015. 212 (2) : 139-148.

21. Tartour E et al. Angiogenesis and immunity : a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of angiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011. 30 (1) : 83-95.
22. Voron Th et al. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.* 2014. 4 (70) : 1-9.
23. Ghiringhelli J. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+ CD25+ regulatory T cell proliferation. *Exp Med.* 2005 202 (7) : 919-929.
24. Voron T et al. Rôle du VEGF dans l'épuisement des lymphocytes T intratumoraux. *m/s.* 2015. 5(31) : 473-5.
25. Shrimali RK et al. Antiangiogenic Agents Can increase Lymphocyte Infiltration into tumor and enhance the Effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 2010. 70 (15) : 6171-80.
26. Huang Y et al. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2013. 73(10) : 2943-48.
27. Bouzin et al. Effects of Vascular Growth Factor on the Lymphocyte-Endothelium interactions : identification of Caveolin-1 and Nitric Oxide as Control points of Endothelial cell Anergy. *J. Immunol.* 2007. 178 (3) : 1505-1511.
28. Marie Bidart, François Berger, Laurent Pelletier. Les thérapies anti-angiogéniques : de la théorie à la pratique. *Ann. Biol Clin* 2013 ; 71 (5) : 2527-35.

29. Pierre Marquet, Pierre-Henry Longerey, Fabrice Barlesi *et al.* Recherche translationnelle : médecine personnalisée, médecine de précision, thérapies ciblées : marketing ou science ? *Thérapie* 2015 janvier-février ; 70 (1) : 1-10.
30. https://www.ligue-cancer.net/article/28456_therapie-ciblee-une-revolution-medicale
31. Jain RK. Normalisation of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 3: 391-400.
32. Yuchen Gu, He Lu, Catherine Boisson-Vidal, Hong Li, Guilhem Bousquet, Anne Janin, Mélanie Di Benedetto. La résistance aux traitements antiangiogéniques Une actualité clinique et scientifique. *médecine/sciences* 2016 ; 32 : 370-7.
33. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2008.04.020>
34. Oudard S, Médioni J, Ayllon J *et al.* Surveillance d'un traitement anti-angiogénique. *Rev Prat Med Gen* 2009 ; 23 : 685-7
35. Giuliano S, Pages G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. *Biochimie* 2013 ; 95 : 1110–1119.
36. Huang L, Perrault C, Coelho-Martins J, *et al.* Induction of acquired drug resistance in endothelial cells and its involvement in anticancer therapy. *J Hematol Oncol* 2013 ; 6 : 49.
37. Huang L, Hu C, Di Benedetto M, *et al.* Cross-drug resistance to sunitinib induced by doxorubicin in endothelial cells. *Oncol Lett* 2015 ; 9 : 1287–1292.

38. Huang L Huang L, Hu C, *et al.* Induction of multiple drug resistance in HMEC-1 endothelial cells after long-term exposure to sunitinib. *Onco Targets Ther* 2014 ; 7 : 2249–2255.
39. Hida K, Akiyama K, Ohga N, *et al.* Tumour endothelial cells acquire drug resistance in a tumour microenvironment. *J Biochem* 2013 ; 153 : 243–249.
40. Schneider BP, Wang M, Radovich M. *et al.* Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol*, 2008 ; 26 : 4672–4678. Erratum. In: *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3070.
41. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:115-121.
42. Lin JH. Transporter-mediated drug interactions: clinical implications and in vitro assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007;3:81-92.
43. Beaune P, Lorient M. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Médecine/Sciences* 2000 ; 16 : 1051-6.
44. V. Amos Aegerter, V. von Gunten, Institut Central (ICHV), Sion. La P-Glycoprotéine, une pompe d'efflux : attention aux interactions Médicamenteuses. *Caduceus Express*. Sept .2011 vol 13 n°6.
45. Meyer U. Genotype or phenotype : the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics* 1991 ; 1 : 66-7.

46. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan R. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TIPS* 1999; 20: 342-9.
47. Blanc JF, Barbare JC, Boige V, Boudjema K, Créhange G, Decaens T, Farges O, Guiu B, Merle P, Selves L, Trinchet JC. «Carcinome hépatocellulaire». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, juin 2015, en ligne [<http://www.tnacd.org>]
48. InVS, *Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015. Rapport technique* en ligne [www.invs.santé.fr].
49. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M (2007) Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 4(7):424–432.
50. Bruix J, Sherman M, Llovet JM et al (2001) Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona 2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 35(3):421–430.
51. Bruix J, Sherman M (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42(5):1208–1236.
52. Lo CM, Ngan H, Tso WK et al (2002) Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35(5):1164–1171.
53. Hilgard P, Hamami M, Fouly AE et al (2010) Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology* 52(5):1741–1749.

54. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 2005;65:5991–95.
55. Xu J, Wang R, Xie ZH, et al. Prostate cancer metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. *Prostate.* 2006;66:1664–73.
56. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005;24:7443–54.
57. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:131–42.
58. Nadim Fares Philippe Ota Fabrice Muscari Philippe Merle Jean-Marie Péron. Carcinome hépatocellulaire : dépistage, diagnostic et traitement. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. Hépatogastro & Oncologie Digestive. Volume 23, numéro 1, Janvier 2016 46-64).
59. I. RUIZ, C. FERAY. Prise en charge du carcinome hépatocellulaire. *Cancer/Radiothérapie* 19 (2015) 410-415.
60. ©2017 VIDAL. Version : 2017.05.0. Données du 12/06/2017
61. Philip JM, Bouché O, Conroy T, Michel P, Penna C, Tournigand C, Chibaudel B, Bedenne L. «Cancer colorectal métastatique». *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, juin 2016, [<http://www.tncd.org>].
62. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T et al. Randomized comparison of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment

of KRAS-wild type metastatic colorectal cancer: German AIO study KRK-0306 (FIRE-3). Lancet Oncol 2014; 15:1065-75.

63. Venook AP, Donna Niedzwiecki D, Heinz-Josef Lenz HJ et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr LBA3).
64. Ye LC, Liu TS, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Zai SD, Ye QH, Xu B, Qin XY, Xu J. Randomised controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. J Clin Oncol 2013;31:1931-8.
65. Gruenberger T, Bridgewater JA, Chau I et al. Randomized, phase II study of bevacizumab with mFOLFOX6 or FOLFOXIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: resectability and safety in OLIVIA. J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 3619).
66. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. Lancet 2007;370:143-52.
67. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, Etienne PL, Texereau P, Auby D, et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2011;12:1032-1044.
68. Koopman M, Antonini NF, Douma J, Wals J, Honkoop AH, Erdkamp FL, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and

oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. Lancet 2007;370:135-42.

69. Cunningham et al. Two different first-line 5-fluorouracil regimens with or without oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer Ann Oncol 2009 ;20 :244-5.
70. Aparicio T, Lavau-Denes S, Phelip JM et al. Randomized phase III trial in elderly patients comparing LV5FU2 with or without irinotecan for first-line treatment of metastatic colorectal cancer (FFCD 2001-02). Ann Oncol 2016.27:121-7.
71. Tabernero J, Pfeiffer P, Cervantes A. Administration of cetuximab every 2 weeks in the treatment of metastatic colorectal cancer: an effective, more convenient alternative to weekly administration? Oncologist 2008;13:113-9.
72. Pfeiffer P, Nielsen D, Bjerregaard J, Qvortrup C, Yilmaz M, Jensen B. Biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy in patients with advanced colorectal cancer after failure to irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil. Ann Oncol 2008;19:1141-5.
73. Bouchahda M, Macarulla T, Liedo G, Lévi F, Elez ME, Paule B, et al. Feasibility of cetuximab given with a simplified schedule every 2 weeks in advanced colorectal cancer: a multicenter, retrospective analysis. Med Oncol. 2010 Nov 5.
74. Ciuleanu T, Nikolic V, Shmueli E, Vrbancic D, Plate S, Z. Krmpotic M, Cetuximab weekly (q1w) versus every two weeks (q2w) plus FOLFOX4 as first-line therapy in patients (pts) with KRAS wild-type (wt) metastatic colorectal cancer (mCRC). J Clin Oncol 29: 2011 (suppl; abstr 3580).
75. Mir O, Alexandre J, Coriat R et al. Safety of bevacizumab 7,5 mg/m² infusion over 10 minutes in NSCLC patients. Invest New Drugs 2012 ;30 :1756-60.

76. Mahfoud T, Tanz R, Mesmoudi M et al. Bevacizumab 5 or 7,5 mg/kg in metastatic colorectal cancer can be infused safely over 10 minutes. J Gastrointest Cancer 2012 ;43 :244-8.
77. Reidy DL, Chung KG, Timoney JP et al. Bevacizumab 5 mg/kg can be infused safely over 10 minutes. J Clin Oncol 2007 ;25 :2691-5.
78. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: An Emphasis on Demographic and Regional Variability. Clin Liver Dis. 2015 May; 19(2):223-238.
79. Maillard E. Epidémiologie, histoire naturelle et pathogenèse du carcinome hépatocellulaire. cancer/radiothérapie. 2011 Feb; 15(1): 3-6.
80. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J et al. Associations between Hepatitis B Virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. J Natl cancer Inst. 2008; 100: 1134-1143.
81. Bruno S, Crasignani A, Maisonneuve P, Rossi S, Sitini E, Mandelli MU. Hepatitis C Virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma on patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. Hepatology. 2007 Aug; 46:1350-1356.
82. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Danata F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factor. Gastroenterology. 2004; 127(5): S35-S50.
83. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T and Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib and nilotinib. Blood. 2011 Feb; 117(8): e75-e87.
84. Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Raoul J, Zeuzen S et al. Sorafénib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma, (HCC): results of a

phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). J Clin Oncol. 2007; 18S (25).

85. European Medicines Agency (EMA), NEXAVAR: EPAR - Scientific Discussion, 2007, [Internet], Available from:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000690/WC500027707.pdf [Consulted 12 May 2015].
86. Monograph of sorafénib. VIDAL Ed. 2014.
87. Ichiro I. Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). Drug Metab Pharmacokinet. 2012; 27(1): 85-105.
88. Blanchet B, Billemont B, Cramard J, Benichou AS, Chhun S, Harcouet L et al. Validation of an HPLC-UV method for sorafénib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. J Pharm Biomed Anal. 2009; 49(4): 1109-1114.
89. Fucile C, Marengo S, Bazzica M, Zuccoli ML, Lantieri F, Robbiano L et al. Measurement of sorafénib plasma concentration by high-performance liquid chromatography in patients with advanced hepatocellular carcinoma: is it useful the application in clinical practice? A pilot study. Med Oncol. 2015 Jan; 32(1): 1-7.
90. Arrondeau J, Mir O, Boudou-Rouquette P, Coriat R, Ropert S, Dumas G et al. Sorafénib exposure decreases over time in patients with hepatocellular carcinoma. Invest New Drugs. 2012 Oct; 30(5):2046-9.
91. Boudou-Rouquette P, Ropert S, Mir O, Coriat R, Billemont B, Tod M et al. Variability of sorafénib toxicity and exposure over time: a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. Oncologist. 2012; 17(9): 1204-1212.

92. Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, Thomas-Schoemann A, Mir O, Taieb F et al. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PloS One*. 2012; 7(8): e42875.
93. Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisch A et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist*. 2007; 12(4): 426-437.
94. Jain L, Woo S, Gardner ER, Dahut WL, Kohn EC, Kummar S et al. Population pharmacokinetic analysis of sorafenib in patients with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Aug; 72(2): 294-305.
95. Van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009; 35: 692–706.
96. Baldissera VD, de Mattos AA, Coral GP, de Araujo FB, Marroni CA, de Mello Brandão AB et al. Evaluation of the C3435T polymorphism in the MDR1 gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2012; 11(6): 899-906.
97. Fukuda M, Kawahara Y, Hirota T, Akizuki S, Shigeto S, Nakajima H et al. Genetic polymorphism of hepatic ABC transporter in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Ther*. 2010; 1(3): 114-123.
98. Gao J, Dafeng People' Hospital. Association of MDR1 gene polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma in the Chinese han population. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Mar; 46(3): 311-7.
99. Timucin M, Algozlu H, Ozdemir S, Ozdemir O. Association between ABCB1 (MDR1) gene polymorphism and unresponsiveness combined therapy in chronic Hepatitis C Virus. *Hepat Mon*. 2013; 13(4): e7522.

100. Bins S, Lenting A, El Bouazzaoui S *et al.* Polymorphisms in *SLCO1B1* and *UGT1A1* are associated with sorafénib-induced toxicity. *Pharmacogenomics*. 2016 Sep;17(14):1483-90.
101. Te Velde EA., Vogten JM., Gebbink MF., *et al.* Enhanced antitumor efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg*. (2002) 89 1302-1309.
102. Emmink BL., Van Houdt WJ., Vries RG., *et al.* Differentiated human colorectal cancer cells protect tumor-initiating cells from irinotecan. *Gastroenterology*. (2011) 141 269-278.
103. Chu C., Abbara C., Tandia M., *et al.* Cetuximab increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma and tumor of human colorectal carcinoma-bearing mice. *Fundam Clin Pharmacol*. (2014) 28 652-660.
104. Wang F., Chen Y., Huang L. *et al.* Cetuximab enhanced the efficacy of chemotherapeutic agent in ABCB1/P-glycoprotein-overexpressing cancer cells. *Oncotarget* (2015) 6 (38) 40850-40865.
105. Li L., Jiang AC., Dong O., *et al.* MDR1/P-gp and VEGF synergistically enhance the invasion of hep-2 cells with multidrug resistance induced by taxol. *Ann Surg Oncol*. 2009 may;16(5):1421-8.
106. Liang H., Zhang Y., Zhang JD., *et al.* Effects of arsenic trioxide on expressions of vascular endothelial growth factor and P-glycoprotein in multidrug resistant leukemia cell line K562/A02. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. (2007) 5 647–650.

107. Broggini-Tenzer A., Sharma A., Nytko K. *et al.* Combines treatment strategies for microtubule stabilizing agent-resistant tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2015) 107(4): dju504.
108. Egron A., Olivier-Abbal P., Gouraud A., *et al.* Preventable and potentially preventable serious adverse reactions induced by oral protein kinase inhibitors through a database of adverse drug reaction reports. *Target Oncol.* (2015) 10 229-234.
109. Yanagisawa M., Yorozu K., Kurasawa M., *et al.* Bevacizumab improves the delivery and efficacy of paclitaxel. *Anticancer drugs.* (2010) **21** 687–694.
110. Ishizuna K., Ninomiya J., Kojima M., *et al.* Paclitaxel-resistant advanced recurrent breast cancer: a case of partial response because of addition of bevacizumab to paclitaxel therapy: a case report. *BMC Res Notes.* (2013);6(1)-254.
111. Candeil L., Gourdier I., Peyron D., *et al.* ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer.* (2004) 109 848-854.
112. Arimori K., Kuroki N., Hidaka M. *et al.* Effect of Pglycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. *Pharm. Res.* (2003) 20 910–917.
113. Bonhomme-Faivre L., Benyamina A., Reynaud M. *et al.* Disposition of Delta tetrahydrocannabinol in CF1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. *Addict. Biol.* (2008) 13.

114. Kovarick JM., beyer D., Bizot MN, *et al.* Pharmacokinetic interaction between verapamil and everolimus healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2005) 60.
115. Linn SC., Giaccone G. MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. Eur J Cancer. (1995) 31A 1291-1294.
116. Tokunaga Y., Hosogi H., Hoppou T., *et al.* Effects of MDR1/P-glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery. Oncol Rep. (2001) **8** 815-819.
117. Goldwirt L., Beccaria K., Carprntier A., *et al* Preclinical impact of bevacizumab on brain and tumor distribution of irinotecan and temozolomide. *J. Neuroocol* (2015) 122:273-281.
118. Ellingson BM., Cloughesy TF., Lai A., *et al.* Quantification of edema reduction using differential quantitative T2 (DQT2) relaxometry mapping in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *J. Neurooncol.* (2012) 106 111–119.
119. Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol.* (2011) **5** 117–129.
120. Vangestel C., Van de Wiele C., Van Damme N., *et al.* (99mTc (CO)(3) His-annexin A5 micro SPECT demonstrates increased cell death by irinotecan during the vascular normalization window caused by bevacizumab. J Nucl Med. (2011) 52 1786-1794.

121. Genentech, Inc. Package insert for avastin (bevacizumab). South San Francisco (2007).
122. Gaudreault J., Shiu V., Bricarello A., *et al.* Concomitant administration of bevacizumab, irinotecan, 5- fluorouracil, and leucovorin: Nonclinical safety and pharmacokinetics. *Int J Toxicol.* (2005) 24 357–363.
123. Nan Qi, Fang Li, Xiaosong Li *et al.* Combination use of paclitaxel and avastin enhances treatment effect for the NSCLC patients with malignant pleural effusion. *Medicine* (2016) 95:47.
124. Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M, Gurney H. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol.* 2012 Nov 10; 30(32): 4017-25.
125. Di Marco V, De Vita F, Koskinas J, Semela D, Toniutto P, Verslype C. *Sorafénib: from literature to clinical practice.* *Ann Oncol.* 2013 Apr; 24 Suppl 2:ii30-ii37.
126. M. Tandia, A. Mhiri, B. Paule, R. Saffroy, V. Cailliez, G Noé, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre. Correlation between clinical response to sorafénib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of Pglycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 Apr; 79(4):759 – 766.
127. Jurjen S. Lagas , Robert A.B. van Waterschoot, Rolf W. Sparidans, Jos H. Beijnen and Alfred H. Schinkel. *Breast Cancer Resistance Protein and P-glycoprotein Limit Sorafénib Brain Accumulation.* *Mol Cancer Ther* February 2010 9; 319-326.
128. Dong J, Zhai B, Sun W, Hu F, Cheng H, Xu J Activation of phosphatidylinositol 3- kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal

transition-induced multi- drug resistance to sorafénib in hepatocellular carcinoma cells. PLoS ONE. 2017; 12(9): e0185088.

129. Maria Rosa Bani ; Alessandra Decio; Raffaella Giavazzi; Carmen Ghilardi.. Contribution of tumor endothelial cells to drug resistance: anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors act as p-glycoprotein antagonists *Angiogenesis* (2017) 20:233–241 DOI 10.1007/s10456-017-9549-6
130. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:361–398. doi:10.1146/ annurev.pharmtox.39.1.361.
131. Ellingson B.M., Cloughesy T.F., Lai A., et al. Quantification of edema reduction using differential quantitative T2 (DQT2) relaxometry mapping in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *J. Neurooncol.* (2012) 106 111–119.
132. Hyun Joo Jang, Bum Jun Kim, Jung Han Kim, Hyeong Su Kim. The addition of bevacizumab in the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: an updated meta-analysis of randomized trials. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 42), pp: 73009-73016.
133. Joleen M. Hubbard, George Kim, Mitesh J. Borad, Elizabeth Johnson, Rui Qin, Janet Lensing, Suneetha Puttabassavaiah, John Wright, Charles Erlichman and Axel Grothey. Phase I trial of FOLFIRI in combinaison with sorafénib and bevacizumab in patients with advanced gastrointestinal malignicies. *Invest New Drugs.* 2016 February; 34(1): 96-103.
134. Philippe V, Zahel T, Bärthel K, Rasch S, Ebert O, Schmid RM, Rummeny E, Algül H. Influence of Sorafénib and Bevacizumab on pancreatic volume – A monocentric CT based analysis. *Pancreatology.* 2016 jul-Aug; 16(4):621-624.

135. Alliance for clinical trials in oncology. Sorafénib and bevacizumab in treating patients with metastatic colorectal cancer. Clinicaltrials.gov. august 2017.
136. C. Chu, M.S. Noël-Hudson, J. Bénard, T. Ha-Duong, F. Allaoui, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre. Cetuximab directly inhibits P-glycoprotein function in vitro independently of EGFR binding. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 76 (2015) 18–26.
137. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):4028-33.
138. Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Jun;32(1-2):211-27.
139. Huang YS, Xue Z, Zhang H. Sorafénib reverses resistance of gastric cancer to treatment by cisplatin through down-regulating MDR1 expression. *Med Oncol*. 2015 Feb;32(2):470 doi: 10.1007/s12032-014-0470-1.
140. Wei L, Huang N, Yang I et al. Sorafénib reverses multidrug resistance of hepatoma cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009 May; 29(5):1016-9, 1023.
141. Ye Q, Chen H-L: Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer: a meta-analysis from four phases III randomized controlled trials. *Arch Gynecol Obstet* 2013, 288:655–666.

142. Pawaskar DK, Straubinger RM, Fetterly GJ, Hylander BH, Repasky EA, Ma WW, et al. Physiologically based pharmacokinetic models for everolimus and sorafénib in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 May;71(5):1219-29.
143. Saber-Mahloogi HM, DE. . Pharmacology review-Sorafénib. Center for Drug Evaluation and Research; Rockville- FDA. 2005. NDA 21,923.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

C. Chu, C. Abbara, **M. Tandia**, *et al.* Cetuximab increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma and tumor of human colorectal carcinoma-bearing mice. *Fundam Clin Pharmacol.* (2014) 28 652-660.

M. Tandia, A. Mhiri, B. Paule, R. Saffroy, V. Cailliez, G Noé, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of Pglycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017 Apr;79(4):759-766.

M. Tandia, J.M. Alili, C. Abbara, M.S. Noel-Hudson, F. Ayadi, M. Polrot, P. Gonin, L. Bonhomme-Faivre. Bevacizumab modulates P-glycoprotein function *in vitro* and increases concentrations of irinotecan and of its active metabolite SN-38 in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice. *Research & Reviews in Pharmacy & Pharmaceutical Sciences Journal RRJPPS* | Volume 6 | Issue 4 | September, 2017 e-ISSN:2320-1215 p-ISSN:2322-0112

M.Tandia, C. Abbara, M.S. Noel-Hudson, D. Amor, M. Polrot, P. Gonin, L. Bonhomme-Faivre. Bevacizumab and Sorafenib modulate P-glycoprotein function *in vitro* and Bevacizumab increases *in vivo* Sorafenib concentrations in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice. Soumis à publication dans *Heliyon-Journal-Elsevier* (2017)

POSTERS

M. Tandia, C. Abbara, M.S. Noel-Hudson, D. Amor, M. Polrot, P. Gonin, L. Bonhomme-Faivre. Bevacizumab inhibits P-glycoprotein function in vitro and increases in vivo sorafenib concentrations in plasma of human colorectal carcinoma-bearing mice. Congrès Frontiers Immunology Research Network, 01-4 juillet 2017 en Grèce.

M.Tandia, A. Mhiri, B. Paule, R. Saffroy, V. Delvart, G. Noé, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre.
Influence of P-glycoprotein (ABCB1) and of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) polymorphism on therapeutic monitoring of sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment. Journée de l'école doctorale Innovation Thérapeutique du fondamental à l'appliqué, faculté de pharmacie Paris sud, 2015 (P60).

Titre : INTERACTIONS ENTRE THERAPIES CIBLEES ANTI-ANGIOGÉNIQUES (BEVACIZUMAB, SORAFÉNIB) ET TRANSPORTEURS D'EFFLUX

Mots clés : ABCB1 pharmacocinétique, pharmacogénétique, bévacizumab, sorafénib, irinotécan

Résumé : Le traitement des cancers constitue un problème de santé publique et repose entre autres sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, le blocage de l'angiogenèse fait l'objet de nombreux essais cliniques.

L'intervention de transporteurs membranaires d'efflux, comme la P-glycoprotéine (P-gp) joue un rôle important sur le plan pharmacocinétique, pharmacogénétique et dans la résistance aux médicaments anticancéreux.

Nous avons observé chez des patients atteints de CHC une grande variabilité des paramètres pharmacocinétiques du sorafénib (inhibiteur de tyrosine kinase, anti-angiogénique et substrat de la P-gp et de la BCRP) et une tendance à une meilleure réponse clinique dans le groupe hétérozygote, ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT et ABCG2 421CA par rapport aux groupes homozygotes (type sauvage et mutant) avec une association significative aux concentrations plasmatiques normalisées aux poids.

Nos travaux ont montré *in vitro* qu'un prétraitement avec des médicaments anti-angiogéniques tels que le bévacizumab et le sorafénib entraînait une réversion de la résistance à la doxorubicine (substrat de la P-gp) dans un modèle de cellules IGR OV1-DXR (résistantes à la doxorubicine et surexprimant la P-gp)

par modulation de la fonctionnalité de la P-glycoprotéine. Cette réversion a été objectivée par l'augmentation significative des concentrations intracellulaires de la doxorubicine dans les cellules IGR OV1-DXR.

Nous avons montré pour la première fois que le bévacizumab, anticorps anti VEGF inhibe la fonctionnalité de la P-gp. Ce médicament est couramment prescrit avec l'irinotécan dans le cadre du traitement du cancer colorectal métastaté.

In vivo chez la souris xénotransplantée de cancer colorectal humain, un prétraitement par le bévacizumab a entraîné une augmentation significative des concentrations plasmatiques du SN38 (métabolite actif de l'irinotécan et substrat de la P-gp), de même que de l'AUC et de la Cmax plasmatique de l'irinotécan (substrat de la P-gp) après administration orale de l'irinotécan. Une augmentation significative de l'AUC plasmatique du sorafénib après un prétraitement par le bévacizumab a été également observée sur le même modèle expérimental.

La modulation d'activité des transporteurs d'efflux par les thérapies ciblées anti-angiogéniques pourrait entraîner une augmentation de la réponse clinique avec une réversion de la résistance des cellules tumorales et endothéliales surexprimant des transporteurs d'efflux et en particulier la P-gp.

Title : INTERACTIONS BETWEEN TARGETED THERAPIES ANTI-ANGIOGENIC (BEVACIZUMAB, SORAFENIB) AND EFFLUX TRANSPORTERS

Keywords : ABCB1, pharmacokinetics, pharmacogenetics, bevacizumab, sorafenib, irinotecan

Abstract: Treatment of cancers is a public health problem and based on surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy and targeted therapies. Among the new therapeutic strategies, blocking of angiogenesis was the subject of several clinical trials.

Intervention of membrane efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) plays an important pharmacokinetic and pharmacogenetic role in anticancer drugs resistance.

We observed in patients with HCC, a great pharmacokinetics parameters variability of sorafenib (tyrosine kinase inhibitor, anti-angiogenic drug and P-gp and BCRP substrate) and a tendency to a better clinical response in the ABCB1 3435 CT, ABCG2 34 GA, ABCG2 1143CT and ABCG2 421CA heterozygous group than in the homozygous group (wild type and mutant).

Our work shows *in vitro* that pretreatment with anti-angiogenic drugs bevacizumab and sorafenib resulted in a resistance reversion to doxorubicin (P-gp substrate) in an IGROV1 – DXR cells (resistant to doxorubicin and P-gp overexpressing cells) by modulating the functionality of P-glycoprotein.

This reversion is measured by the significant increase in intracellular doxorubicin concentrations in IGR OV1-DXR cells.

We showed for the first time that bevacizumab, an anti VEGF antibody, inhibits the functionality of P-gp. This drug is commonly prescribed with irinotecan for the treatment of metastatic colorectal cancer.

In vivo in human colorectal cancer xenograft mice, bevacizumab pretreatment led to a significant increase in plasma concentrations of SN38 (active metabolite of irinotecan and P-gp substrate), as well as plasma AUC and Cmax of irinotecan (P-gp substrate) after administration of irinotecan. Similarly, a significant increase in plasma AUC of sorafenib after bevacizumab pretreatment was observed on the same experimental model.

The modulation of efflux transporter activity by targeted anti-angiogenic therapies could lead to an increase in the clinical response with a reversion of the resistance of tumor and endothelial cells overexpressing efflux transporters, particularly P-gp.