



Analyses pronostiques en oncologie pédiatrique : Identification de facteurs de susceptibilité tumorale ou individuelle à l'efficacité et/ou à la toxicité des traitements anticancéreux utilisés chez l'enfant

Brice Fresneau

► To cite this version:

Brice Fresneau. Analyses pronostiques en oncologie pédiatrique : Identification de facteurs de susceptibilité tumorale ou individuelle à l'efficacité et/ou à la toxicité des traitements anticancéreux utilisés chez l'enfant. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS034 . tel-03559508

HAL Id: tel-03559508

<https://theses.hal.science/tel-03559508>

Submitted on 7 Feb 2022

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.

Analyses pronostiques en oncologie pédiatrique :
Identification de facteurs thérapeutiques, tumoraux
ou constitutionnels associés à l'efficacité ou à la
toxicité des traitements anticancéreux

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°570 EDSP | Santé publique
Spécialité de doctorat: santé publique - épidémiologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 06 février 2020, par

Fresneau Brice

Composition du Jury

Gérard Michel PU-PH, Université Aix Marseille, APHM	Président & Rapporteur & Examineur
Christine Binquet PU-PH, Université de Bourgogne, CHU de Dijon	Rapporteur & Examineur
Emmanuel Lagarde PHD-HDR-DR, Université de Bordeaux (INSERM U897)	Examineur
Guy Launoy PU-PH, Université de Caen (INSERM U1086)	Examineur
Hervé Perdry MCU, Université Paris 11 - UPSud (CESP-Genostat)	Examineur
Florent De Vathaire PHD-HDR-DR, Université Paris 11 - UPSud (INSERM U1018)	Directeur de thèse
Gwénaél Le Teuff PHD, Université Paris 11 - UPSud (CESP-Oncostat)	Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mr DE VATHAIRE Florent et Mr LE TEUFF Gwénaél, mon directeur et mon co-directeur de thèse, pour leur confiance, leur attention, leur soutien et leur pédagogie tout au long de la préparation de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Je tiens à remercier chacun des membres de mon jury pour avoir accepté de juger ce travail et d'y consacrer une partie de leur temps précieux.

Je tiens ensuite à remercier le Dr VALTEAU-COUANET Dominique, chef du département de cancérologie de l'enfant et de l'adolescent de Gustave Roussy, qui a soutenu la préparation de cette thèse en permettant l'aménagement de mon temps de travail entre mon activité clinique d'oncologue pédiatre à Gustave Roussy et mon activité de recherche en thèse au sein de l'unité INSERM U1018 – CESP Equipe 3.

Je remercie également tous mes collègues de l'unité INSERM U1018 – CESP Equipe 3 et du département de cancérologie de l'enfant et de l'adolescent de Gustave Roussy, qui m'ont apporté leur soutien et ont pu enrichir ce travail par le partage de réflexions et de discussions toujours passionnantes. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus sincère sympathie.

Je tiens également à remercier le Dr LEDELEY Marie-Cécile, qui m'a encouragé dès mon clinicat à travailler la recherche clinique, la biostatistique et l'épidémiologie de façon à pouvoir ensuite m'orienter vers un M2 de génétique statistique puis en thèse. Un grand merci pour ton soutien et la confiance que tu m'as accordée dès le début en permettant et soutenant ma formation dans ces domaines.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, et tout particulièrement ma conjointe, le Dr SEBILLE Gwendoline, qui m'a soutenu à chaque instant, jour après jour, dans la préparation de cette thèse et dans mon activité clinique.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
Table des matières	4
LISTE DES PUBLICATIONS.....	5
Publications issues du travail de thèse.....	5
Communications orales.....	6
Posters.....	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION.....	11
Epidémiologie des cancers de l'enfant.....	11
Guérir plus, guérir mieux, les défis de l'oncologie pédiatrique	12
Problématique et objectifs.....	15
PARTIE 1 : Marqueurs tumoraux pronostiques en oncologie pédiatrique, l'exemple de la décroissance de l'alfa-foetoprotéine sous chimiothérapie dans les tumeurs germinales malignes.....	18
PARTIE 2 : Facteurs constitutionnels associés à l'efficacité ou à la toxicité des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie, études d'interaction sexe x traitement et analyses pharmacogénétiques	64
I- Evaluation de l'effet du sexe masculin/féminin sur l'efficacité et la toxicité des agents alkylants	64
II- Evaluation de l'impact pronostique de polymorphismes génétiques de gènes impliqués dans le métabolisme du méthotrexate sur l'efficacité et la toxicité du méthotrexate haute dose dans le traitement de l'ostéosarcome.....	99
PARTIE 3 : Effets des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie sur le risque de survenue d'évènement tardifs toxiques, l'exemple de la toxicité auditive dans la cohorte FCCS	145
PERSPECTIVES ET CONCLUSION	173
REFERENCES.....	176
ANNEXES	186

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications issues du travail de thèse

Article 1

Investigating the heterogeneity of alkylating agents' efficacy and toxicity between sexes: A systematic review and meta-analysis of randomized trials comparing cyclophosphamide and ifosfamide (MAIAGE study).

Fresneau B, Hackshaw A, Hawkins DS, Paulussen M, Anderson JR, Judson I, Litière S, Dirksen U, Lewis I, van den Berg H, Gaspar N, Gelderblom H, Whelan J, Boddy AV, Wheatley K, Pignon JP, De Vathaire F, Le Deley MC, Le Teuff G.

Pediatr Blood Cancer. 2017 Aug;64(8). doi: 10.1002/pbc.26457.

Article 2

Is alpha-fetoprotein decline a prognostic factor of childhood non-seminomatous germ cell tumours? Results of the French TGM95 study.

Fresneau B, Orbach D, Faure-Contier C, Sudour-Bonnange H, Vérité C, Gandemer V, Pasquet M, Fasola S, Rome A, Raimbault S, Martelli H, Frappaz D, Le Teuff G, Patte C.

Eur J Cancer. 2018 May;95:11-19. doi: 10.1016/j.ejca.2018.02.029.

Article 3

New insight into severe ototoxicity after childhood cancer Is there an impact of melphalan and busulfan? A French Childhood Cancer Survivor Study

Fresneau B, Santos F, Allodji R, Fayeche C, Bolle S, Vu-Bezin G, Souchart V, Haddy N, Doz F, Berchery D, Lemire P, Journy N, Veres C, Brugieres L, Valteau-Couanet D, Diallo I, Dufour C, De Vathaire F

Soumis à *Journal of Clinical Oncology* le 19.06.2019

Article 4

Investigation of the heterogeneity of Methotrexate efficacy and toxicity in osteosarcoma patients: an OS2006 pharmacogenetic ancillary study

Fresneau B, Lui G, Treluyer JM, Le Deley MC, Piperno-Neumann S, Pacquement H, Lervat C, Marec-Berard P, Entz Werle N, Mahier C, De Vathaire F, Bouazza N, Brugieres L, Le Teuff G
For The Sarcoma Group Of Unicancer

En preparation

Article 5

A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Osteosarcoma Patients Treated With High-Dose Methotrexate: Data From the OS2006/Sarcoma-09 Trial.

Lui G, Treluyer JM, Fresneau B, Piperno-Neumann S, Gaspar N, Corradini N, Gentet JC, Marec Berard P, Laurence V, Schneider P, Entz-Werle N, Pacquement H, Millot F, Taque S, Freycon C, Lervat C, Le Deley MC, Mahier Ait Oukhatar C, Brugieres L, Le Teuff G, Bouazza N; Sarcoma Group of UNICANCER.

J Clin Pharmacol. 2018 Dec;58(12):1541-1549. doi: 10.1002/jcph.1252.

Communications orales

Is alpha-fetoprotein decline a prognostic factor of childhood non-seminomatous germ cell tumours? Results of the French TGM95 study.

Congrès de la société internationale d'oncologie pédiatrique (SIOP), Dublin, octobre 2016

Posters

New insight into severe ototoxicity after childhood cancer: is there an impact of melphalan and busulfan? A French Childhood Cancer Survivor Study

ASCO 2019, SIOP 2019

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : courbes de survie sans progression (PFS) et de survie globale (OS) selon le groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique.	42
Figure 2 : Histogrammes décrivant la variation de l'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie (n=151).	49
Figure 3 : Profils individuels de décroissance de l'AFP (échelle logarithmique).	50
Figure 4 : Temps théorique de normalisation de l'AFP (TTN) en fonction de la valeur observée d'AFP avant la première cure de chimiothérapie (M0) et de la valeur calculée d'AFP à J21 à partir d'un modèle de décroissance exponentielle à demi-vie variable de 4 à 7 jours.	54
Figure 5 : Evaluation de la capacité de discrimination des différents modèles pronostiques de décroissance de l'AFP à l'aide de la statistique c de Uno (calculée au temps maximal de survenue d'un évènement soit 1.91 an) et des courbes ROC tracées aux temps 0.5, 1 et 1.5 ans.	58
Figure 6 : Représentation schématique de la stratégie thérapeutique utilisée en traitement du sarcome d'Ewing.	65
Figure 7 : Procédure de sélection des essais inclus dans la méta-analyse.	75
Figure 8 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survie sans progression dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).	80
Figure 9 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survie globale dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).	82
Figure 10 : Courbes de survie sans progression en fonction du type d'agent alkylant (cyclophosphamide vs. ifosfamide) et du sexe estimées à partir de la population globale de la méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV).	85
Figure 11 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe et de la catégorie d'âge (<12 ans, 12-18 ans, >18 ans) sur la survie sans progression dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) (modèle à effets fixes).	86
Figure 12 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe et de la catégorie d'âge (<12 ans, 12-18 ans, >18 ans) sur la survie globale dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) (modèle à effets fixes).	87
Figure 13 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité hématologique de type leucopénie/neutropénie sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).	91
Figure 14 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité infectieuse sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).	92
Figure 15 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité rénale sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).	93
Figure 16 : Stratégie thérapeutique incluant les schémas de chimiothérapie utilisés en fonction de l'âge dans l'essai clinique OS2006.	102

Figure 17 : Diagramme de flux des patients inclus dans l'essai Clinique OS2006 et génotypés pour l'analyse pharmacogénétique du méthotrexate (MTX).	112
Figure 18 : Diagramme de flux pour l'analyse d'association entre SNP et réponse histologique pour les 187 patients inclus dans l'analyse pharmacogénétique et	115
Figure 19 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et réponse histologique.	117
Figure 20 : Courbes ROC.....	120
Figure 21 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et survie sans progression (PFS).	123
Figure 22 : Description de la toxicité aiguë liée au méthotrexate (MTX) au cours du temps.....	128
Figure 23 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et survenue d'au moins un épisode de toxicité aiguë sévère au méthotrexate (MTX).	130
Figure 24 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et nombre d'épisodes de toxicité aiguë sévère au méthotrexate (MTX).	133
Figure 25 : Etude de la forme fonctionnelle des variables continues dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne et doses cumulées de carboplatine et de cisplatine avec recherche d'un écart à log-linéarité par analyse des résidus de Martingale.	161
Figure 26 : Représentation de la relation dose-effet entre la dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne et le risque d'ototoxicité sévère.	163
Figure 27 : Courbes de probabilités cumulées d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif dans la FCCSS en fonction de l'exposition au busulfan et de la dose de RT à l'oreille interne.	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques détaillées des patients selon le groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique.	36
Tableau 2 : Caractéristiques détaillées des patients selon le site tumoral primitif.	38
Tableau 3 : Détail des événements et des décès en fonction du groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique et des caractéristiques initiales de la tumeur (site tumoral primitif et statut métastatique indiqués entre parenthèses)	43
Tableau 4 : Analyse pronostique de la survie sans progression (PFS) à l'aide d'un modèle de Cox multivarié (i) sur l'ensemble de la population (n=239) et (ii) restreinte aux patients traités dans les groupes de risque intermédiaire (IR) ou élevé (HiR) (n=179).	45
Tableau 5 : Taux de survie sans progression (PFS) et de survie globale (OS) à cinq ans en fonction de l'âge au moment du diagnostic et des sites tumoraux primitifs pour l'ensemble de la population (n=239, 35 événements, 17 décès).	46
Tableau 6 : Caractéristiques des 151 patients inclus dans l'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP.	48
Tableau 7 : Analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP sur la survie sans progression (PFS).	57
Tableau 8 : Caractéristiques des essais cliniques randomisés inclus dans la méta-analyse comparant cyclophosphamide et ifosfamide.	76
Tableau 9 : Caractéristiques des patients randomisés dans chaque essai inclus dans la méta-analyse.	77
Tableau 10 : Estimations des Hazard Ratios (HR) associés aux termes d'interaction sexe * traitement pour la survie sans progression dans le l'essai EE99-R1, l'ensemble de validation EICESS92 + IRS-IV et la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) dans les analyses principales et de sensibilité.	83
Tableau 11 : Nombre de patients ayant présenté au moins une toxicité sévère par sexe et par groupe de randomisation dans chaque essai inclus dans la méta-analyse	89
Tableau 12 : Description des trois essais randomisés ayant comparés l'ifosfamide et le cyclophosphamide mais exclus de la méta-analyse car n'ayant inclus que des femmes.	96
Tableau 13 : Caractéristiques cliniques, histologiques et thérapeutiques des 253 patients inclus dans l'essai clinique randomisé OS2006, ayant débuté leur chimiothérapie préopératoire avec un schéma à base de méthotrexate (MTX), et inclus ou non dans l'analyse pharmacogénétique du MTX.	114
Tableau 14 : Description des 5 SNP significativement associés à la réponse histologique.	118
Tableau 15 : Modèle pharmacogénétique multivarié modélisant la probabilité de mauvaise réponse histologique.	119
Tableau 16 : Description des 9 SNP significativement associés à la survie sans progression (PFS).	124
Tableau 17 : Modèle pharmacogénétique multivarié pour la survie sans progression (PFS).	125
Tableau 18 : Fréquence des épisodes de toxicités aiguës sévères liées au méthotrexate (MTX) pour l'ensemble des cures de MTX et par patient.	127
Tableau 19 : Description des 19 SNP significativement associés à la survenue d'au moins un épisode de toxicité aiguë sévère secondaire à une cure de méthotrexate (MTX).	131
Tableau 20 : Description des 39 SNP significativement associés à la répétition des épisodes de toxicité aiguë sévère au méthotrexate (MTX).	134
Tableau 21 : Résultats des analyses d'associations entre polymorphismes génétiques (SNP) et efficacité ou toxicité aiguë de la chimiothérapie par Méthotrexate haute dose précédemment rapportées dans les études pharmacogénétiques réalisées chez les patients atteints d'ostéosarcome.	139

Tableau 22 : Caractéristiques cliniques de l'ensemble des patients inclus dans l'analyse ototoxicité (avec ou sans ototoxicité sévère appareillée) en fonction du type de cancer pédiatrique.	152
Tableau 23 : Caractéristiques cliniques des patients ayant développé une ototoxicité sévère et porteur d'appareillage auditif en fonction du type de cancer pédiatrique.....	154
Tableau 24 : Résultats de l'analyse univariée avec présentation des probabilités cumulées de survenue d'une ototoxicité sévère nécessitant le port d'appareillage auditif avant l'âge de 30 et de 50 ans pour différentes caractéristiques cliniques et thérapeutiques (comparaison par test du log-rank).	156
Tableau 25 : Résultats de l'analyse multivariée sur le risque d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif dans la FCCSS.....	160
Tableau 26 : Modèles et coefficients estimés pour la relation dose-effet entre la dose moyenne d'irradiation à l'oreille interne et le risque d'ototoxicité sévère.....	162

INTRODUCTION

Epidémiologie des cancers de l'enfant

Chaque année 2500 enfants et adolescents sont diagnostiqués avec un cancer en France dont 1700 avant l'âge de 14 ans et la moitié avant l'âge de 5 ans.^{1,2} Les leucémies (29%) et les tumeurs cérébrales (23%) sont les pathologies les plus fréquentes, représentant environ la moitié des pathologies malignes de l'enfant, tandis que chez l'adolescent, les principaux types de cancer observés sont les lymphomes (33%), puis les carcinomes (13%), les leucémies (13%) et les tumeurs cérébrales (13%). Le cancer est la quatrième cause de décès chez l'enfant (7% des décès), après les infections de la période périnatale (35%), les malformations et anomalies chromosomiques (17%) et les causes externes (accidents, suicides) (11%, données issues du Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de Décès, CépiDc, de l'INSERM). Chez l'adolescent, le cancer représente la troisième cause de décès (12% des décès) après les accidents (51%) et les suicides (16%).

Comparativement à l'adulte, les cancers de l'enfant et de l'adolescent sont très rarement secondaires à des expositions environnementales cancérigènes démontrées. De plus, les facteurs génétiques prédisposant aux cancers ne sont identifiés que dans environ 10% des cas.³ Concernant l'effet stochastique (lié aux probabilités de mutation et de réparation à chaque division cellulaire dans les tissus), s'il est susceptible d'expliquer jusqu'à 65% de la variation du risque de cancer entre les tissus chez l'adulte, la survenue du cancer à un âge très jeune conduit à considérer le cancer pédiatrique comme très probablement non lié à cet effet stochastique dans ces modèles.⁴ Les facteurs étiologiques des cancers pédiatriques restent donc encore méconnus et si l'hypothèse d'une interaction entre un environnement favorisant et des

facteurs génétiques de « fragilité » (y compris immunitaire) est séduisante, elle n'a jusqu'à présent pas été démontrée.

Guérir plus, guérir mieux, les défis de l'oncologie pédiatrique

Les progrès thérapeutiques de l'oncologie pédiatrique ont permis une amélioration des taux de survie globale à 5 ans qui atteignent aujourd'hui plus de 80% chez l'enfant et l'adolescent. Cependant un tel taux global de guérison masque des différences de taux de survie considérables, variant de quasi 100% pour certaines hémopathies malignes comme les lymphomes non hodgkiniens de la lignée B, dits de type Burkitt, à moins de 50% pour les sarcomes osseux multi métastatiques et moins de 10% pour les gliomes infiltrant du tronc cérébral. Des progrès importants sont donc encore à réaliser pour permettre d'améliorer les taux de guérison, en particulier dans certaines pathologies de mauvais pronostic ou en cas de récurrence.

Pour ce faire des efforts importants ont été réalisés pour développer de nouvelles thérapeutiques, d'abord sous forme de combinaisons de chimiothérapies avec des soins de support adaptés permettant de gérer de manière adéquate la toxicité aiguë de ces traitements intensifs, ensuite sous forme de thérapeutiques dites ciblées bien que le plus souvent non spécifiques car reconnaissant des antigènes surreprésentés sur les cellules tumorales en rapport avec l'activation de voies de signalisation intra cellulaire favorisant la prolifération cellulaire, et enfin sous forme d'immunothérapies, c'est-à-dire de thérapies susceptibles de déclencher ou d'accroître la réponse immune de l'individu envers la tumeur.

En parallèle les efforts ont été poursuivis dans l'identification des facteurs pronostics de façon à optimiser la stratification thérapeutique, autrement dit à intensifier le traitement des patients avec tumeurs de plus haut risque et désescalader celui des patients avec tumeur de bas risque. Ces nouveaux facteurs pronostiques peuvent être identifiés au diagnostic ou liés à l'effet du traitement. Ainsi, les analyses tumorales au diagnostic (histologiques et moléculaires :

génomique, transcriptomique...) permettent l'optimisation de la stratification thérapeutique, tandis que l'analyse de l'évolution des biomarqueurs au cours du temps sous traitement (marqueurs sériques sécrétés par les cellules tumorales, analyses tumorales moléculaires à la récurrence) peuvent être utiles à la stratification thérapeutique secondaire (patients avec mauvaise réponse au traitement de première ligne) ou au choix d'un traitement à la progression (identification d'une évolution tumorale moléculaire rendant la maladie potentiellement sensible à un traitement ciblé ou au contraire expliquant la survenue d'une résistance au traitement devant conduire à une modification thérapeutique).

Le second objectif majeur est d'améliorer la qualité de la guérison. En effet, on estime à entre 30 et 50.000 le nombre d'adultes vivant en France qui ont été traités pendant l'enfance pour un cancer. Ces patients ont souvent reçu des traitements intensifs ou multimodaux occasionnant une morbidité à long terme importante compliquée d'un taux de mortalité entre 8 et 11 fois plus important que dans la population générale⁵⁻⁷. Une étude de la *St Jude Lifetime Cohort Study* (SJLIFE) a ainsi montré que 67.6% (95% CI, 65.3%-69.8%) des adultes traités pour un cancer pendant l'enfance souffraient d'au moins un problème de santé chronique sévère ou invalidant (étude menée sur 1713 patients traités à un âge médian de 6 ans, avec un recul médian de 25 ans)⁷. Les récurrences, les seconds cancers, les pathologies cardio-vasculaires et les pathologies respiratoires sont les complications sévères les plus fréquentes responsables d'un excès de mortalité dans cette population⁷. A titre d'exemple, concernant les pathologies cardiaques, les risques de coronaropathie, d'insuffisance cardiaque clinique, de valvulopathie et d'arythmie sont fortement augmentés par rapport à la population générale, en rapport notamment avec l'irradiation de l'aire cardiaque et l'administration de chimiothérapie à base d'anthracyclines^{8,9}. Les résultats de ces études épidémiologiques ont conduit à considérer les survivants à long terme d'un cancer pédiatrique comme un groupe à haut risque de complications tardives nécessitant une prise en charge spécifique. C'est dans ce contexte qu'en 2008 a été créé le

groupe européen *PanCare* pour améliorer la prise en charge et la qualité de vie de ces anciens patients en Europe⁹. En France, cet objectif a été inscrit dans le troisième plan cancer 2014-2019 (Action 8.2 : Structurer le suivi à long terme des enfants et adolescents).

Pour répondre aux besoins de santé spécifiques de ces anciens patients, a été fondée en 2012 la clinique de suivi à long terme du département de cancérologie de l'enfant et de l'adolescent à Gustave Roussy, soutenue par l'Institut National du Cancer (InCa). La mise en place de cette clinique s'est faite en partenariat avec l'unité INSERM U1018 (équipe 3 : épidémiologie des radiations, chef d'équipe : F. de Vathaire) à Gustave Roussy. Cette équipe s'intéresse depuis plus de 20 ans aux effets à long terme des traitements utilisés en oncologie pédiatrique et en particulier de la radiothérapie. Une première étude de cohorte multicentrique (EURO2K) concernait les patients traités entre 1942 et 1986 dans 8 centres français et anglais. Cette cohorte a ensuite été étendue aux patients traités entre 1986 et 2000 dans tous les centres français d'oncologie pédiatrique (*French Childhood Cancer Survivor Study FCCSS*). Cette étude épidémiologique a donné lieu à de nombreuses publications, en particulier sur la mortalité et les causes de mortalité des survivants à long terme de cancer pédiatrique, les risques de seconds cancers, de pathologies cardio- et cérébro-vasculaires, de diabète, de cataracte...¹⁰⁻¹⁶ La description épidémiologique des effets tardifs et l'identification des facteurs de risque de ces complications est indispensable pour améliorer le suivi à long terme de ces patients (quel suivi pour quel patient et à quelle fréquence) et proposer des adaptations des thérapeutiques oncologiques ou des soins de support en prenant en considération dès le diagnostic les risques d'effets tardifs (à titre d'exemple, limitation des thérapeutiques à haut risque cumulé d'effets tardifs cardiaques : limitation des doses cumulées d'anthracyclines et des indications, des champs et des doses d'irradiation médiastinale, modification des techniques d'irradiation médiastinale pour limiter les doses délivrées aux organes à risque, adaptation de la thérapeutique aux résultats des explorations cardiologiques en cours de traitement...). Les

programmes de recherche épidémiologique et clinique dans le domaine du suivi à long terme sont donc développés pour répondre à ces questions d'identification des facteurs de risque et d'optimisation des modalités de suivi à long terme.

Problématique et objectifs

Le travail de thèse ici présenté vise à explorer au travers de différents travaux de recherche clinique et épidémiologique en oncologie pédiatrique l'intérêt d'une approche multimodale considérant, le patient, la tumeur et les traitements comme autant de facteurs à prendre en considération dans les analyses d'efficacité et de toxicité aiguë et à long terme. L'effet direct de chacun de ces facteurs est à considérer, mais les interactions entre ces facteurs sont également à prendre en compte dans une démarche analytique de la survenue des événements observés, qu'il s'agisse de récidives ou d'événements toxiques. Le travail se décline en trois parties correspondant aux trois objectifs principaux de la thèse :

- L'étude du caractère pronostique de l'évolution de facteurs tumoraux sous traitement.
Nous avons ainsi analysé l'impact pronostique de la décroissance du marqueur tumoral alfa-foetoprotéine (AFP) en cours de chimiothérapie dans les tumeurs germinales malignes pédiatriques.
- L'étude de l'impact de facteurs constitutionnels, liés à l'individu, sur l'efficacité et la toxicité des traitements anti-cancéreux utilisés en oncologie pédiatrique. Pour ce faire, nous avons réalisé une méta-analyse d'essais randomisés sur données individuelles visant à étudier l'interaction entre le sexe et le type d'alkylant (cyclophosphamide ou ifosfamide) sur l'efficacité et la toxicité aiguë. En outre, nous nous sommes intéressés à l'effet de polymorphismes génétiques (SNP) impliqués dans le métabolisme et les voies de transport du méthotrexate sur l'efficacité et la toxicité aiguë dans le traitement des patients atteints d'ostéosarcome traités par méthotrexate haute dose.

- L'étude de l'impact des thérapeutiques anti-cancéreuses utilisées en oncologie pédiatrique sur la survenue d'évènements tardifs. Nous avons ainsi analysé les facteurs de risque de survenue de toxicité auditive sévère dans la cohorte française des patients survivants à 5 ans d'un cancer solide pédiatrique (*French Childhood Cancer Survivor Study*, FCCSS).

PARTIE 1 :

Marqueurs tumoraux pronostiques en oncologie pédiatrique

PARTIE 1 : Marqueurs tumoraux pronostiques en oncologie pédiatrique, l'exemple de la décroissance de l'alfa-foetoprotéine sous chimiothérapie dans les tumeurs germinales malignes

INTRODUCTION

Les tumeurs germinales malignes (TGM) représentent 3 à 5% des tumeurs malignes de l'enfant et de l'adolescent avant l'âge de 15 ans.^{1,17} Développées à partir des cellules germinales primordiales totipotentes, elles se localisent préférentiellement dans les gonades (testicule et ovaire), mais elles peuvent aussi se rencontrer dans d'autres localisations en rapport avec une migration anormale des cellules germinales pendant la vie embryonnaire. Les autres localisations principales sont la région sacro-coccygienne, le médiastin et le rétro-péritoine. Des formes primitivement cérébrales peuvent également se développer, en particulier dans les régions supra-sellaire et pinéale. La prise en charge de ces dernières étant spécifique nous centrerons notre propos sur les TGM extra-cérébrales. Les TGM sont classées en deux catégories : les TGM séminomateuses, issues de cellules très indifférenciées, et les TGM non séminomateuses (TGM-NS), issues de cellules germinales plus avancées dans leur différenciation. Les TGM-NS sont les plus fréquemment rencontrées chez l'enfant et l'adolescent. Il en existe différents types histologiques, le principal étant le type vitellin, responsable d'une sécrétion anormale dans le sang d'alfa-foetoprotéine (AFP).

Physiologiquement l'AFP est sécrétée par le foie, à des niveaux élevés à la naissance, qui diminuent progressivement avec le temps jusqu'à atteindre vers l'âge de 18-24 mois une concentration sanguine similaire à celle mesurée à l'âge adulte.¹⁸⁻²⁰ En cas de TGM, ce marqueur est le plus souvent augmenté, en particulier en pédiatrie du fait de la prépondérance

des formes vitellines pures ou mixtes (contingent vitellin associé à un autre contingent pouvant lui-même être responsable d'une sécrétion pathologique d'un autre marqueur, l'hormone gonadotrophine chorionique ou hCG). Cependant ce marqueur n'est pas spécifique des TGM ; il peut être ascensionné dans d'autres pathologies tumorales comme non-tumorales.²¹

Ce marqueur est avant tout utilisé pour le suivi de la maladie sous traitement et au décours, sa diminution étant le témoin de l'efficacité du traitement, sa négativation de la disparition du contingent sécrétant et sa ré-ascension soit de l'émergence d'un clone cellulaire résistant au traitement soit d'une récurrence après traitement.

Au diagnostic, la valeur pronostique du taux d'AFP a été démontrée dans les TGM testiculaires et médiastinales de l'adulte, d'où son utilisation aujourd'hui comme facteur de stratification thérapeutique.²² En pédiatrie, la valeur pronostique du taux initial d'AFP est controversée. Dans l'expérience française, les résultats des études TGM85 et 90 avaient mis en évidence un impact pronostique péjoratif des taux élevés d'AFP, en plus de l'extension de la maladie.^{23,24} Mais une analyse récente de la base de données internationale MaGIC n'a pas confirmé ce résultat, identifiant comme facteurs pronostiques majeurs: le site de la tumeur, l'extension de la maladie et l'âge au diagnostic.²⁵

L'AFP peut également être considérée dans son aspect dynamique. En particulier se pose la question de la valeur pronostique de sa cinétique de décroissance sous chimiothérapie. Dans les TGM testiculaires et médiastinales de haut risque de l'adulte (définies par la présence de métastases extra-pulmonaires, la localisation tumorale primitive médiastinale ou des marqueurs tumoraux très élevés au diagnostic), la cinétique de décroissance de l'AFP a été identifiée comme un facteur pronostique indépendant, aussi bien en première ligne qu'en rechute.^{26,27} Ceci a conduit à l'élaboration d'une stratégie thérapeutique adaptée à la réponse à la chimiothérapie estimée par la cinétique de décroissance de l'AFP avec intensification

thérapeutique précoce en cas de cinétique défavorable.²⁸ En gynécologie adulte, la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP dans les TGM ovariennes a également été mise en évidence.²⁹ Par contre, en pédiatrie, aucune étude n'avait été publiée sur ce sujet avant le travail ici présenté.

Nous présentons dans cette première partie de la thèse les résultats de l'étude TGM95 menées dans les TGM pédiatriques extra-cérébrales par la Société Française d'Oncologie Pédiatrique (SFOP, renommée Société Française des Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent, SFCE), et en particulier les résultats de l'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP. Ce travail a été publié dans l'*European Journal of Cancer* en 2018 (Annexe 1).

PATIENTS ET MÉTHODES

Population d'analyse

L'étude TGM95 est une étude prospective non randomisée menée entre 01/1995 et 12/2005 chez des patients âgés de moins de 18 ans et atteints de TGM extra-cérébrales ou de tumeurs des cordons sexuels. Les résultats concernant les TGM séminomateuses et les tumeurs des cordons sexuels ont été publiés précédemment.^{30,31} Nous présentons ici l'analyse des résultats concernant la population des patients atteints de TGM-NS. Le diagnostic de TGM-NS était retenu sur la mise en évidence d'une sécrétion anormale d'AFP ou hCG, ou sur la présence en histologie d'au moins un contingent tumoral germinal non séminomateux (vitellin, choriocarcinome ou carcinome embryonnaire).^{32,33} La biopsie n'était donc pas requise en cas de tumeur de localisation compatible avec une TGM (gonadique, sacro-coccygienne ou médiastinale) avec sécrétion élevée de marqueurs. Le bilan d'extension comportait une évaluation loco-régionale et métastatique de la maladie, avec recherche systématique de métastases pulmonaires et hépatiques.

Stratégie thérapeutique

La stratégie thérapeutique était basée sur l'extension de la maladie et la concentration sérique de marqueurs tumoraux au diagnostic. En cas de tumeur localisée et si une résection complète et «non mutilante» incluant l'organe d'origine était réalisable, la chirurgie première était recommandée. En cas de maladie avancée, une chimiothérapie préopératoire était recommandée, suivie d'une intervention chirurgicale différée pour exérèse complète de toute lésion résiduelle et résection de l'organe d'origine. La résection complète était définie comme suit: résection tumorale en bloc incluant l'organe d'origine, sans rupture tumorale et avec des marges de résection histologiquement saines (stade pS1 en cas de chirurgie initiale).

Sur la base des études TGM antérieures^{23,24}, trois groupes de risque ont été définis en fonction du caractère complet ou non de la résection initiale (pS1/non-pS1), du taux initial d'AFP (< vs. ≥ 15.000 ng/ml) et du statut métastatique (M-/M+). Dans le groupe de faible risque (tumeurs pS1 avec AFP <15.000 ng/ml), une stratégie attentiste a été adoptée, avec chimiothérapie retardée en cas de progression biologique (augmentation de l'AFP) et/ou radiologique. Dans le groupe de risque intermédiaire (RI) (tumeur incomplètement réséquée ou non résécable avec AFP <15.000 ng/ml), les patients recevaient 3 à 5 cures de VBP (vinblastine 3 mg/m²/j, Jours J1-2, bléomycine 15 mg/m²/ j J1-2, cisplatine 100 mg/m²/j J3). Dans le groupe de haut risque (Présence de métastases et/ou AFP ≥ 15.000 ng/ml), les patients recevaient 4 à 6 cures de VIP (étoposide 75 mg/m²/j / J1-5, ifosfamide 3g/m²/j J1-2, cisplatine 20 mg/m²/ j J1-5). Le nombre total de cycles était variable et non défini *a priori* car dépendant de la normalisation des marqueurs. Si la normalisation des marqueurs était obtenue au maximum après 3 cycles pour le groupe IR ou 4 cycles pour le groupe HiR, deux cycles de chimiothérapie supplémentaires étaient administrés après normalisation des marqueurs pour totaliser 3 à 5 cures de VBP ou 4 à 6 cures de VIP, respectivement. Si la normalisation des marqueurs n'avait pas été obtenue après 3 cycles pour le groupe IR ou 4 cycles pour le groupe HiR, une intensification thérapeutique était recommandée avec passage à une chimiothérapie de type VIP pour le groupe IR ou de type carboplatine/bléomycine/doxorubicine pour le groupe HiR.

Méthodologie statistique

Analyse de survie

Nous avons dans un premier temps réalisé une analyse de survie, en considérant la survie sans progression (PFS, définie par l'intervalle de temps entre le premier jour de traitement et la date de survenue du premier évènement parmi progression, récurrence et décès, quelle qu'en soit la

cause, ou en l'absence d'évènement la date de dernières nouvelles) et la survie globale (OS, définie par l'intervalle de temps entre le premier jour de traitement et la date de décès, quelle qu'en soit la cause, ou pour les patients vivants aux dernières nouvelles, la date de dernières nouvelles). La majoration de taille de la composante tératomateuse mature sous traitement (*growing teratoma*) n'a pas été considérée comme un événement ni la survenue d'un tératome mature pur sur l'ovaire controlatéral (tumeur bénigne). PFS et OS ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier³⁴ et les intervalles de confiance à 95% des taux de survie (IC95%) ont été calculés par la méthode Rothman.³⁵

La méthode de Kaplan-Meier est une méthode non-paramétrique d'analyse de survie. Soit T le temps de survie. La fonction de survie ou probabilité de survivre au temps t s'écrit donc :

$$S(t) = \mathbb{P}(T \geq t)$$

Soit $t_1, t_2, \dots, t_K$ les temps de décès observés ordonnées de manière croissante :

$$S(t_j) = \mathbb{P}(\{T \geq t_j\} \cap \{T \geq t_{j-1}\}) = \mathbb{P}(T \geq t_j | T \geq t_{j-1}) \mathbb{P}(T \geq t_{j-1})$$

Par récurrence,

$$S(t_j) = \mathbb{P}(T \geq t_j | T \geq t_{j-1}) \mathbb{P}(T \geq t_{j-1} | T \geq t_{j-2}) \dots \mathbb{P}(T \geq t_1 | T \geq t_0) \mathbb{P}(T \geq t_0)$$

Avec $\mathbb{P}(T \geq t_0) = S(0) = 1$, soit

$$S(t_j) = \prod_{i:t_i \leq t_j} \mathbb{P}(T \geq t_i | T \geq t_{i-1})$$

Considérons au temps t_i , n_i le nombre de sujets exposés et m_i le nombre de sujets décédés :

$$\mathbb{P}(T \geq t_i | T \geq t_{i-1}) = \frac{n_i - m_i}{n_i}$$

Une estimation de $S(t_j)$ est donc :

$$\widehat{S(t_j)} = \prod_{i:t_i \leq t_j} \frac{n_i - m_i}{n_i}$$

A ceci s'ajoute la notion de censure. Ainsi au temps t_i , le nombre de sujets exposés n_i correspond au nombre de sujets exposés au temps précédent t_{i-1} (n_{i-1}) retranché du nombre de sujets décédés au temps t_{i-1} (m_{i-1}) et du nombre de sujets censurés entre t_{i-1} et t_i (c_{i-1}).

L'intervalle de confiance de l'estimation ponctuelle de la fonction de survie $\widehat{S(t_j)}$ est calculé à partir de l'estimateur de Greenwood³⁶ de la variance de $\widehat{S(t_j)}$. en utilisant une approximation par la loi normale :

$$IC(\alpha) = \left[\widehat{S(t_j)} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\widehat{\text{Var}}(\widehat{S(t_j)})} \right]$$

Or quand $\widehat{S(t_j)}$ est proche de 0 ou de 1, l'intervalle de confiance étant symétrique autour de $\widehat{S(t_j)}$, les bornes peuvent dépasser les valeurs 0 ou 1. On préfère par conséquent utiliser l'intervalle de confiance de Rothman :

$$IC(\alpha) = \frac{K}{K + \frac{(z_{\alpha})^2}{2}} \left[\widehat{S(t_j)} + \frac{\frac{(z_{\alpha})^2}{2}}{2K} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\widehat{\text{Var}}(\widehat{S(t_j)}) + \frac{\frac{(z_{\alpha})^2}{2}}{4K^2}} \right]$$

Où

$$K = \frac{\widehat{S(t_j)} (1 - \widehat{S(t_j)})}{\widehat{\text{Var}}(\widehat{S(t_j)})}$$

Analyse pronostique

Nous avons ensuite réalisé une analyse pronostique en utilisant comme critère de jugement la PFS et comme modélisation, un modèle de Cox multivarié incluant comme covariables l'âge au diagnostic ($<$ vs. ≥ 10 ans), le site tumoral primitif (1-testicule, 2-ovaire, 3-extragenadique), l'étendue de la maladie (1-stade pS1, 2-dissémination régionale, 3-dissémination métastatique) et le taux d'AFP au diagnostic ($<$ vs. ≥ 10.000 ng/ml), sans processus de sélection préalable. Ces variables et leurs seuils de catégorisation ont été choisis en référence aux publications sur les facteurs pronostiques des TGM de l'adulte et de l'enfant.^{22,25}

Le modèle de Cox³⁷ exprime la fonction de risque instantané $h(t)$ de survenue d'un évènement en fonction du temps t et de P covariables $X_1, X_2, \dots, X_p$. Il s'agit d'un modèle semi-paramétrique puisque la fonction de risque de base, $h_0(t)$, n'est pas estimée. Le modèle de Cox s'écrit comme suit :

$$h(t) = h_0(t) \exp \left(\sum_{i=1}^p \beta_i X_i \right)$$

Avec β_i le coefficient de régression de la covariable X_i et e^{β_i} le rapport des risques instantanés. Ce modèle suppose (i) l'hypothèse des risques proportionnelles et (ii) l'hypothèse de log linéarité pour les covariables continues. La première hypothèse suppose que le rapport des risques instantanés (*Hazard Ratio*, HR) est indépendant du temps (autrement dit, les coefficients de régression β_i sont indépendants du temps et donc constants au cours du temps). La seconde hypothèse suppose que le rapport des risques instantanés est constant pour une augmentation d'une unité quelle que soit la valeur de la covariable. Ces deux hypothèses peuvent être testées. Pour l'hypothèse des risques proportionnels, il est possible d'utiliser (a) des méthodes graphiques (par exemple, pour une covariable à deux modalités, on peut estimer la fonction de survie dans les deux groupes et tracer les courbes $\log - \log S(t)$, on vérifie ensuite que les

courbes obtenues présentent un écart constant au cours du temps), (b) les résidus de Schoenfeld³⁸ ou (c) d'introduire dans le modèle un terme d'interaction entre la covariable d'intérêt et le temps. L'hypothèse de log-linéarité pour les variables continues peut être testée par (a) la méthode des résidus de Martingale³⁹ ou (b) des extensions du modèle de Cox en utilisant des fonctions *splines*⁴⁰.

L'estimation des paramètres du modèle (β_i) est réalisée classiquement par la méthode du maximum de vraisemblance partielle. La vraisemblance d'une valeur donnée est la probabilité d'obtenir une valeur telle qu'elle est observée. Soit R_i l'ensemble des individus à risque au temps t_i . La probabilité d'observer un évènement au temps t_i chez le sujet k est donnée par la formule suivante :

$$v_k = \frac{h_0(t_i) \exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,k} X_{i,k})}{\sum_{j \in R_i} h_0(t_i) \exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,j} X_{i,j})_0} = \frac{\exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,k} X_{i,k})}{\sum_{j \in R_i} \exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,j} X_{i,j})}$$

La vraisemblance partielle du modèle de Cox s'écrit donc au temps t_i :

$$V = \prod_{k=1}^n \frac{\exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,k} X_{i,k})}{\sum_{j \in R_i} \exp(\sum_{i=1}^n \beta_{i,j} X_{i,j})_0}$$

Et sa log-vraisemblance :

$$L = \log(V) = \sum_{k=1}^n \left(\sum_{i=1}^n \beta_{i,k} X_{i,k} - \log \sum_{j \in R_i} \exp \left(\sum_{i=1}^n \beta_{i,j} X_{i,j} \right) \right)$$

L'estimation du maximum de vraisemblance est la valeur $\hat{\beta}$ de β qui rend maximum la vraisemblance du modèle V (ou sa log-vraisemblance L).

$$U(\hat{\beta}) = \frac{\delta L(\hat{\beta})}{\delta \beta} = 0$$

Il s'agit ensuite de tester l'hypothèse nulle des β_i par la méthode de Wald (maximum de vraisemblance), du rapport de vraisemblance ou du score.

Dans notre étude, l'estimation des HR et de leurs intervalles de confiance à 95% a été réalisée en utilisant l'approche pénalisée du maximum de vraisemblance décrite par Firth et adaptée par Heinz et Schemper.⁴¹ Cette méthode a été choisie pour réduire le biais des estimateurs du maximum de vraisemblance lié à la petite taille de la population d'analyse et au faible nombre d'évènements observés.

Les patients du groupe de faible risque ont été exclus de l'analyse pronostique dans la mesure où la stratégie attentiste adoptée visait à sélectionner par la survenue de la récurrence les patients nécessitant une chimiothérapie, conduisant de ce fait à un sur-risque de récurrence important dans ce groupe comparativement aux groupes de risque intermédiaire et de haut risque dans lesquels les patients étaient traités systématiquement par chimiothérapie pour réduire leur risque de récurrence.

Analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP

Dans un troisième temps, nous avons évalué la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP sous chimiothérapie. Ont été inclus dans cette analyse les patients traités dans les groupes IR et HiR, ayant un taux d'AFP élevé avant la première cure de chimiothérapie et pour lesquels étaient disponibles une mesure du taux d'AFP avant la seconde cure. Les patients du groupe LR ayant secondairement reçu de la chimiothérapie n'ont pas été inclus dans cette analyse, les données de décroissance de l'AFP n'étant pas disponibles dans cette population.

La décroissance de l'AFP a été modélisée à partir de des données de dosages réalisés avant la première cure de chimiothérapie et avant la seconde cure (à 3 semaines). Trois approches ont

été utilisées: le temps théorique de normalisation de l'AFP (tel que publié précédemment dans les études adultes²⁶, approche 1), la différence entre les valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie (approche 2) et la différence entre l'aire sous la courbes (AUC) de la décroissance de l'AFP observée et l'AUC de la décroissance de l'AFP attendue (approche 3).

Dans l'approche 1, nous nous sommes intéressés au temps théorique de normalisation de l'AFP (TTN) qui est une estimation du nombre de semaines nécessaires à la normalisation de l'AFP. Considérant une décroissance de l'AFP linéaire en échelle logarithmique, et sachant M0 la valeur d'AFP avant la première cure de chimiothérapie et M1 la valeur d'AFP après la première cure de chimiothérapie (mesurée 3 semaines plus tard), le nombre de semaines nécessaires pour obtenir une valeur normale de l'AFP (MN) peut être calculé comme suit :

$$TTN = 3 \times \frac{\log_{10}(M0) - \log_{10}(MN)}{\log_{10}(M0) - \log_{10}(M1)}$$

La valeur pronostique du TTN a été étudiée d'une part comme variable quantitative et d'autre part comme variable binaire. La catégorisation du TTN en deux classes a été réalisée selon la méthode originale décrite par l'équipe de Fizazi et *al.*²⁶ Une décroissance favorable a été définie par la normalisation de l'AFP après la première cure de chimiothérapie ou par un TTN <9 semaines. Une décroissance défavorable a été définie par une augmentation de l'AFP après la première cure de chimiothérapie ou par un TTN ≥ 9 semaines. Le seuil de 9 semaines a été choisi car il s'agissait de la valeur médiane du TTN dans notre population, qu'il était identique à celui utilisé dans l'étude originale de Fizazi et *al.*, et que son interprétation était cliniquement pertinente car correspondant à une normalisation estimée du taux de marqueurs après trois cures de chimiothérapie.

Dans l'approche 2, nous avons considéré la différence en échelle logarithmique entre M0 (valeur d'AFP avant la première cure de chimiothérapie) et M1 (valeur d'AFP après la première cure de chimiothérapie) :

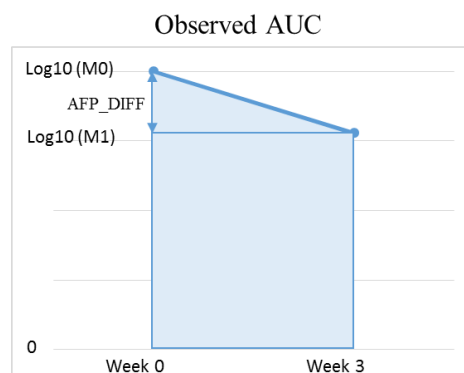
$$AFP_DIFF = \log_{10}(M1) - \log_{10}(M0)$$

Une décroissance favorable a été définie par une réduction de l'AFP d'un log10 après une cure de chimiothérapie ($AFP_DIFF \leq -1$).

Dans l'approche 3, nous avons considéré l'écart entre la décroissance observée de l'AFP sous traitement et sa décroissance théorique selon un modèle exponentiel de demi-vie fixée à 7 jours. Nous avons pour cela calculé la différence entre les aires sous la courbe de décroissance de l'AFP observée et attendue (AFP_AUC).

Nous avons tout d'abord calculé l'aire sous la courbe de décroissance de l'AFP observée ($AFP_AUC_{\text{observed}}$) en tenant compte des valeurs d'AFP observées avant et après la première cure de chimiothérapie (soit 3 semaines plus tard) :

$$AFP_AUC_{\text{observed}} = \frac{abs(AFP_DIFF) \times 3}{2} + \log_{10}(M1) * 3$$



Nous avons ensuite estimé l'aire sous la courbe de décroissance de l'AFP attendue ($AFP_AUC_{\text{expected}}$) en tenant compte de la valeur d'AFP observée avant la première cure de chimiothérapie

et de la valeur d'AFP attendue après la première cure de chimiothérapie, soit 3 semaines après le dosage initial. La valeur d'AFP attendue a été calculée en considérant une baisse «optimale» de l'AFP, c'est-à-dire fonction de sa demi-vie, fixée à 7 jours. La valeur retenue de la demi-vie théorique de l'AFP correspond aux données de la littérature (demi-vie variable selon les sources de 4 à 10 jours) et à la médiane de la demi-vie de l'AFP observée dans notre population d'analyse. Par conséquent, en considérant une décroissance théorique de l'AFP selon sa demi-vie ($t_{1/2}$) fixée à 7 jours, le taux d'AFP théorique au temps t (en jours) peut être calculé à partir de sa valeur initiale $M0$ selon la formule de décroissance suivante correspondant à un modèle exponentiel :

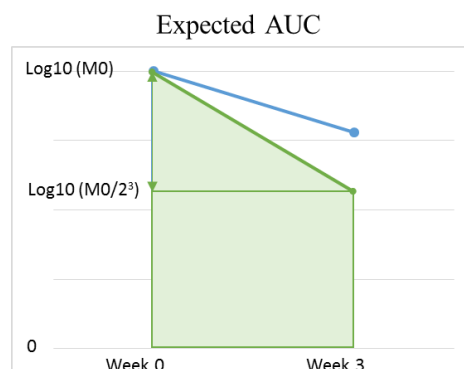
$$AFP(t) = M0 \times 2^{-t/t_{1/2}} = M0 \times 2^{-t/7}$$

La valeur attendue d'AFP à 3 semaine ($M1$) est donc de :

$$M1 = \frac{M0}{2^3}$$

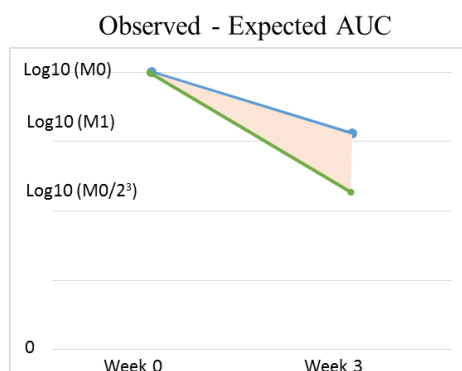
Il est dès lors possible d'estimer l'AFP_AUC attendue :

$$AFP_AUC_{\text{expected}} = \frac{\left(\text{abs} \left(\log_{10} \left(\frac{M0}{2^3} \right) - \log_{10}(M0) \right) \times 3 \right)}{2} + \log_{10} \left(\frac{M0}{2^3} \right) \times 3$$



Enfin, nous avons calculé la différence entre les AUC observées et attendues (AFP_AUC_DIFF) :

$$\text{AFP_AUC_DIFF} = \text{AFP_AUC}_{\text{observed}} - \text{AFP_AUC}_{\text{expected}}$$



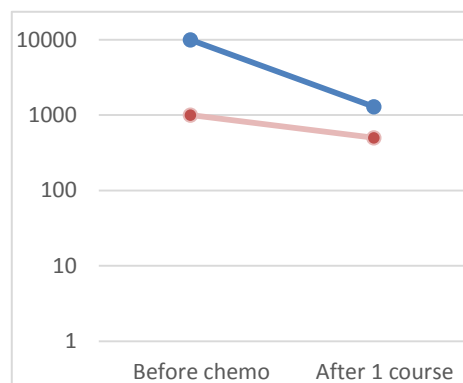
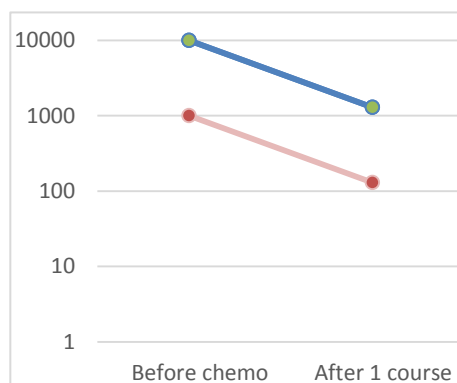
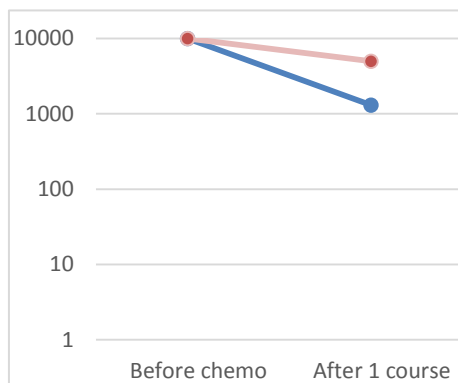
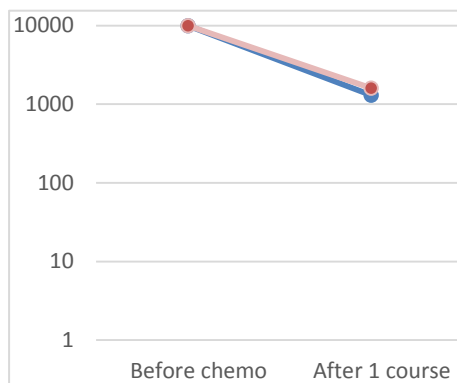
La différence entre les AUC observées et attendues est égale à 0 lorsque la valeur d'AFP observée après la première cure de chimiothérapie est égale à la valeur d'AFP attendue. Elle augmente lorsque la valeur d'AFP observée après la première cure de chimiothérapie est supérieure à la valeur d'AFP attendue traduisant une décroissance d'AFP moindre que la décroissance théorique calculée avec un modèle exponentiel à demi-vie fixée à 7 jours.

Dans les approches 1 (TTN) et 3 (AUC), la décroissance de l'AFP a été modélisée en considérant un intervalle de temps de 3 semaines entre les dosages d'AFP avant la première cure de chimiothérapie et avant la seconde cure. Cependant, contrairement à la date du dosage d'AFP avant la première cure de chimiothérapie (M_0) qui était connue et correspondait au premier jour de chimiothérapie, la date précise du dosage d'AFP avant la seconde cure (M_1) n'était pas disponible. Elle a donc été approximée par la date de début du second cycle de chimiothérapie, réalisée à 3 semaines du début de la première cure.

Dans les approches 2 (AFP_DIFF) et 3 (AUC), les variables modélisant la décroissance de l'AFP ont été considérées comme des variables quantitatives. Comme la distribution de l'AFP n'était pas normale et avec une grande variabilité, une transformation logarithmique a été utilisée.

Nous avons illustré ces approches par 4 scénarios pour 2 patients fictifs.

	Scénario 1		Scénario 2		Scénario 3		Scénario 4	
	Intercepts identiques, pentes identiques		Intercept identiques, pentes différentes		Intercepts différents, pentes identiques		Intercepts différents, pentes différentes	
AFP	patient 1	patient 2	patient 1	patient 2	patient 1	patient 2	patient 1	patient 2
Avant chimiothérapie	10000	10000	10000	10000	10000	1000	10000	1000
Après 1 cure	1300	1600	1300	5000	1300	130	1300	500
Approche 1: TTN	10,16	11,31	10,16	29,90	10,16	6,77	10,16	19,93
Approche 2: différence	-0,89	-0,80	-0,89	-0,30	-0,89	-0,89	-0,89	-0,30
Approche 3: AUC	0,03	0,16	0,03	0,90	0,03	0,03	0,03	0,90



L'approche considérant la valeur d'AFP comme une variable dépendante du temps n'a pas été retenue comme pertinente puisque la deuxième mesure a toujours été effectuée avant le deuxième cycle de chimiothérapie, à 3 semaines du dosage initial.

L'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP a été réalisée en utilisant un modèle de Cox ajusté sur l'âge au diagnostic ($<$ vs. ≥ 10 ans), le site tumoral primitif (1-testicule, 2-ovaire, 3-extragonadique), l'étendue de la maladie (1-stade pS1, 2-dissémination régionale, 3-dissémination métastatique) et le taux d'AFP au diagnostic ($<$ vs. ≥ 10.000 ng/ml).

La capacité de discrimination des modèles pronostiques correspondant à chacune des approches utilisées a été évaluée à l'aide de la statistique c de Uno (une valeur proche de 1 indique une bonne discrimination).⁴² Les courbes ROC (*Receiver Operating Characteristic*) aux temps 0.5, 1 et 1.5 ans (aucun événement en PFS survenus au-delà de 1.9 ans) ont été tracées pour chacun des modèles.

Tous les tests étaient bilatéraux avec un risque de première espèce alpha fixé à 0,05. Les logiciels SAS 9.4 et R 3.0.2 ont été utilisés pour les analyses statistiques.

Le comité d'éthique de l'établissement a été consulté et le consentement des parents ou des tuteurs a été obtenu conformément aux exigences nationales en matière d'éthique de la recherche.

RÉSULTATS

Deux cent trente-neuf patients atteints de TGM-NS ont été inclus (92 garçons et 147 filles, âge médian: 3 ans, intervalle=0,1-18 ans). Les caractéristiques des patients sont détaillées dans les **Tableau 1** et **Tableau 2**. Les localisations les plus fréquentes étaient les gonades (ovaires et testicules, 60%) puis le sacro coccyx (24%). Cinquante-deux patients (22%) avaient une maladie métastatique au diagnostic.

Les marqueurs tumoraux AFP et HCG ont été mesurés au moment du diagnostic chez tous les patients sauf deux, et étaient augmentés chez tous les patients sauf un patient ayant une tumeur composée de carcinome embryonnaire uniquement : 183 patients avaient une élévation de l'AFP seule, 47 de l'AFP et de l'HCG et 6 de l'HCG seule. Soixante-dix-neuf patients avaient une AFP au diagnostic ≥ 15.000 ng/ml.

Une histologie au diagnostic était disponible pour 156/157 patients ayant eu une biopsie ou une chirurgie première (non disponible pour 1 patient). Avant l'âge de 10 ans, la tumeur vitelline pure ou associée à du tératome immature sans autre composant germinale malin était le type histologique le plus fréquemment observé (86% des patients) tandis qu'après l'âge de 10 ans, le type histologique le plus fréquemment observé était la tumeur germinale maligne mixte, c'est-à-dire associant diverses composantes germinales malignes parmi tumeur vitelline, choriocarcinome et carcinome embryonnaire (53%).

Une chirurgie première a été réalisée chez 123 patients et considérée comme complète (pS1) pour 60 d'entre eux. Les 116 autres patients ont reçu une chimiothérapie première. Au total, 60 patients ont été classés dans le groupe LR, 65 dans le groupe IR et 114 dans le groupe HiR.

Tableau 1 : Caractéristiques détaillées des patients selon le groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique.

	Risk groups			Total
	Low risk	Intermediate risk	High risk ^s	
Number of patients	60	65	114	239
Sex				
Male	46 (77%)	18 (28%)	28 (25%)	92 (38%)
Female	14 (23%)	47 (72%)	86 (75%)	147 (62%)
Age at diagnosis				
<10 years	47 (78%)	33 (51%)	66 (58%)	146 (61%)
≥10 years	13 (22%)	32 (49%)	48 (42%)	93 (39%)
AFP at diagnosis				
<15,000 ng/ml	60 (100%)	65 (100%)	35 (31%)	160 (67%)
≥15,000 ng/ml	-	-	79 (69%)	79 (33%)
Presence of metastases				
No	60 (100%)	65 (100%)	62 (54%)	187 (78%)
Yes	-	-	52 (46%)	52 (22%)
Primary tumor site				
Testis	44 (73%)	8 (12%)	14 (12%)	66 (28%)
Ovary	14 (23%)	26 (40%)	37 (32%)	77 (32%)
Sacrococcygeal	1 (2%)	17 (26%)	39 (34%)	57 (24%)
Mediastinum	-	5 (8%)	11 (10%)	16 (7%)
Retroperitoneum	-	4 (6%)	2 (2%)	6 (3%)
Vagina	-	5 (8%)	5 (4%)	10 (4%)
Other*	1 (2%)	-	6 (5%)	7 (3%)
Therapeutic sequence				
First surgery	60 (100%)	30 (46%)	33 (29%)	123 (51%)
- Adjuvant CT	14 (23%)	30 (100%)	33 (100%)	77 (63%)
- Second look surgery	-	9 (30%)	10 (30%)	19 (15%)
First CT	-	35 (54%)	81 (71%)	116 (49%)
- Delayed surgery	-	34 (97%)	79 (98%)	113 (97%)
Median follow-up (range) (years)	5.0 (0-12)	5.9 (0-14)	5.5 (0-14)	5.5 (0-14)
Events for PFS				
Progression	14	2	6	22
Relapse	-	4	6	10
Bilateralization	-	1	-	1
Death	1	1	-	2*
5-year PFS (95%CI)	74% (61-84%)	87% (77-93%)	89% (82-94%)	85% (80-89%)
Second malignancies	1	2	2	5†
Deaths				
From tumor	1	5	8	14
From 2 nd malignancy	1	-	-	1
From other causes	1	1	-	2*
5-year OS (95%CI)	94% (84-98%)	92% (82-96%)	93% (86-96%)	93% (89-95%)

CT: chimiothérapie, PFS: survie sans progression, OS: survie globale, CI: intervalle de confiance

* Autres sites: utérus, fosse pterygopalatine, cavités nasales, palais, pénis, fesse, épiploon

§ Causes de classification dans le groupe haut risque HiR autres que AFP ≥ 15.000 ng/ml et métastases: tumeurs médiastinales M0 pour lesquelles la bléomycine était contre-indiquée (2 cas), tumeur sphénoïdale M0 avec extension intracrânienne (1 cas), tumeur testiculaire M0 mais avec de gros ganglions lymphatiques rétropéritonéaux et AFP très élevée (14.062 ng/ml, 1 cas) et tumeurs ovariennes M0 (3 cas de grosses tumeurs ovariennes rompues sans dosage du taux de marqueur préopératoire et 2 cas de tumeurs ovariennes sécrétant de l'AFP progressant rapidement après la chirurgie.

♦ Un décès lié à une leucémie aiguë myéloblastique (LAM) synchrone de type 2 avec iso12p (groupe LR) et 1 secondaire à un accident de la voie publique (groupe IR).

† Second tumeurs malignes: LAM de type 5 avec t(8; 16) (groupe LR), hémangioendothéliome hépatique, TGM rétropéritonéale (groupe IR), LAM de type 4 avec del (7q) et inv (16) et transformation maligne de localisations pulmonaires de tératome en cancer de la thyroïde (groupe HiR).

Tableau 2 : Caractéristiques détaillées des patients selon le site tumoral primitif.

	Site							Total
	Testis	Ovary	SC*	Med	RP	Vagina*	Other*	
Number of patients	66	77	57	16	6	10	7	239
Females	0	77	46	7	2	10	5	147
Age ≥10 years	24	58	-	8	2	-	1	93
AFP at diagnosis ≥15,000 ng/ml	4	29	31	6	2	3	4	79
Presence of metastases	10	8	25	3	1	2	3	52
Risk group								
LR	44	14	1	-	-	-	1	60
IR	8	26	17	5	4	5	-	65
HiR	14	37	39	11	2	5	6	114
Therapeutic sequence								
First surgery	59	56	5	1	1	-	1	123
- Adjuvant CT	21	48	5	1	1	-	1	77
- Second look surgery	6	11	2	-	-	-	-	19
First CT	7	21	52	15	5	10	6	116
- Delayed surgery	7	21	50	15	5	9	6	113
- No surgery	-	-	2	-	-	1	-	3

SC=sacrocoecy, med=médiastin, RP=rétropéritoine, LR=groupe de risque faible, IR=groupe de risque intermédiaire, HiR=groupe de risque élevé

* Autres sites: utérus, fosse pterygopalatine, cavités nasales, palais, pénis, fesse, épiploon

♦ Tous les patients atteints de tumeurs sacrococcygiennes étaient âgés de moins de 3 ans au diagnostic, à l'exception de deux patients âgés de 5,2 et 6,7 ans.

• Tous les patients atteints de tumeurs vaginales étaient âgés de moins de 2 ans au diagnostic.

Description des patients traités dans le groupe de bas risque LR (n=60)

Parmi les 60 patients traités par chirurgie seule, une progression tumorale est survenue chez 14 d'entre eux (23%, 6/44 patients avec localisation testiculaire, 6/14 patientes avec localisation ovarienne et 2/2 patients avec localisation extragonadique). La récurrence est survenue 1 à 13 mois après la chirurgie (médiane=4,5 mois). La progression était uniquement biologique (n=2) ou radiologique ± biologique (n=11, données non disponibles dans un cas). Ces 14 patients ont reçu une chimiothérapie différée (9 VBP, 5 VIP). Deux d'entre eux ont souffert d'un second événement tumoral (seconde rechute de tumeur ovarienne et leucémie aiguë myéloblastique de type 5). De plus, une jeune fille atteinte d'une tumeur ovarienne a développé une leucémie aiguë myéloblastique de type 2 synchrone avec des cellules leucémiques porteuse d'un isochromosome iso12p signant l'origine germinale des cellules leucémiques. Ces trois patients sont décédés.

Description des patients traités dans le groupe de risque intermédiaire IR (n=65)

Trente patients ont eu une chirurgie première, suivis d'une chimiothérapie, tandis que 35 ont reçu une chimiothérapie première. Tous les patients ont reçu un traitement par VBP, sauf un qui a reçu du carboplatine au lieu du cisplatine pour une insuffisance rénale initiale. Treize patients (20%) ont eu une intensification de la chimiothérapie avec passage du VBP au VIP en raison de la présence de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire en fin de chimiothérapie (n=2), d'une résection incomplète lors de la chirurgie réalisée en fin de chimiothérapie (n=3) ou de l'absence de normalisation des marqueurs tumoraux après 3 cures de VBP (n=8). Le nombre médian de cures de chimiothérapie administrées était de 4 (intervalle : 2-7). Dix événements sont survenus: 6 progressions/rechutes (1/8 patients avec localisation testiculaire, 1/2 patientes avec localisation ovarienne et 4/31 patients avec localisation

extragonadique ; cinq d'entre eux sont décédés de la maladie), 1 bilatéralisation, 2 tumeurs malignes secondaires et 1 décès par accident de la voie publique.

Description des patients traités dans le groupe de risque élevé HiR (n=114)

Ont été inclus dans ce groupe, 52 patients M+, 53 patients M- avec AFP ≥ 15.000 ng/ml et 9 patients M- avec AFP < 15.000 ng/ml mais considérés comme à risque élevé de récurrence pour diverses raisons (Tableau 1, page 36). Trente-trois patients ont eu une chirurgie première tandis que 81 ont reçu une chimiothérapie première. Tous ont reçu une chimiothérapie par VIP sauf deux (VBP, raisons non spécifiées). Douze patients ont eu une intensification de la chimiothérapie avec passage du VIP au régime carboplatine-bléomycine-doxorubicine (n=10), vinorelbine-ifosfamide-épirubicine (n=1) ou VBP (n=1) en raison de la présence de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire en fin de chimiothérapie (n=5) ou de l'absence de normalisation des marqueurs tumoraux (n=7). De surcroît, quatre patients ont reçu de manière non protocolaire une chimiothérapie à haute dose en raison de la présence de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire en fin de chimiothérapie (2 patients traités par étoposide-thiotépa et 2 par carboplatine-étoposide-cyclophosphamide). Le nombre médian de cures de chimiothérapie administrées était de 5 (intervalle : 1-9). Quatorze événements sont survenus: 12 progressions/rechutes (4/14 patients avec localisation testiculaire, 0/37 patientes avec localisation ovarienne et 8/63 patients avec localisation extragonadique ; huit d'entre eux sont décédés de la maladie) et 2 tumeurs malignes secondaires (dont un patient ayant fait deux événements tumoraux consécutifs: d'abord une leucémie aiguë myéloblastique puis une rechute de sa tumeur germinale maligne sacrococcygienne dont il est décédé).

Analyse de survie

Après un suivi médian de 5,5 ans (intervalle : 0,1-14,2), 32 progressions/rechutes, 1 bilatéralisation, 5 tumeurs malignes secondaires et 17 décès sont survenus (**Tableau 3**). Toutes les rechutes sont survenues dans les 2 ans suivant le diagnostic. La PFS et l'OS à cinq ans étaient respectivement de 85% (IC95%=80-89%) et de 93% (89-95%). Les courbes de survie sans progression et de survie globale de chaque groupe de risque sont rapportées dans la **Figure 1**.

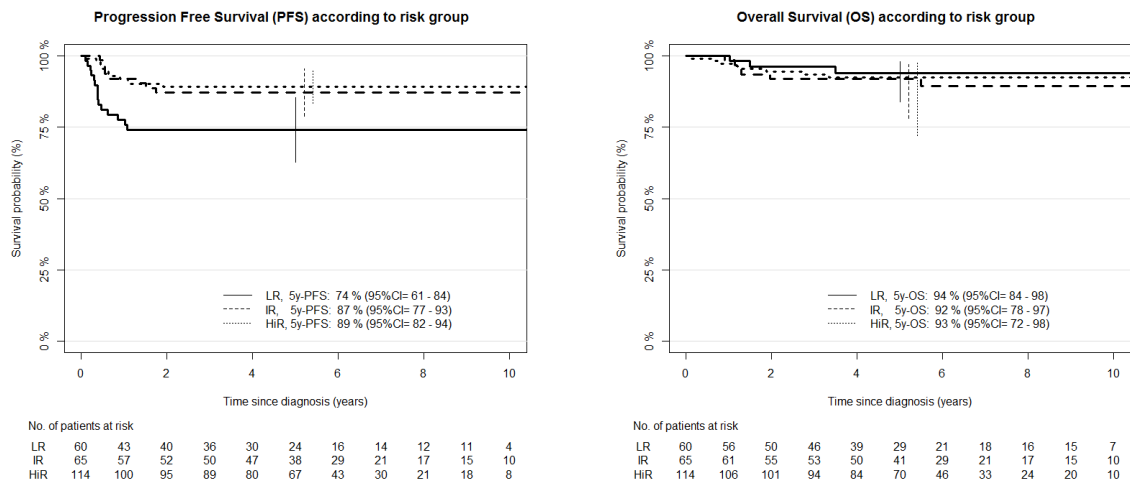


Figure 1 : courbes de survie sans progression (PFS) et de survie globale (OS) selon le groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique.

PFS et OS ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier³⁴ en considérant comme date d'origine la date de premier jour de traitement, chirurgical ou médical (date du premier jour de chimiothérapie). Les intervalles de confiance à 95% des taux de survie (95%CI) ont été calculés par la méthode Rothman.³⁵

Tableau 3 : Détail des événements et des décès en fonction du groupe de risque utilisé pour la stratification thérapeutique et des caractéristiques initiales de la tumeur (site tumoral primitif et statut métastatique indiqués entre parenthèses)

Group	First event						Deaths			
	Progression	Relapse	Bilateralization	Second malignancy	Death	All events	Death from tumor	Death after second malignancy	Death from other cause	All deaths
LR n=60	14 (6 ov M0*, 6 testis M0, 1 SC M0, 1 penile shaft M0)				1 TRD of “germ cell” AML (ov M0)	15	1	1	1	3
IR n=65	2 (1 med M0, 1 RP M0)	4 - 2 local (1SC M0, 1med M0) - 2 distant (1ov M0, 1 testis M0)	1 (ov M0)	2 1 hemang. (SC M0) 1 RP GCT (testis M0)	1 accident (ov M0)	10	5		1	6
HR n=114	6 (3 testis M1, 3 SC M1)	5 - 2 local (1 SC M0, 1 SC M1) - 3 distant brain (1 testis M1, 1 SC M0, 1 SC M1)		2 - 1 AML (SC M1)** - 1 thyroid K*** (med M1)	-	13	8**			8
Total	22	9	1	4	2	38	14	1	2	17

AML: leucémie aiguë myéloblastique, “germ cell” AML: AML synchrone avec cellules leucémiques iso12p +, GCT: tumeur germinale, Hemang: hémangioendothéliome hépatique métastatique, HiR: groupe de risque élevé, IR: groupe de risque intermédiaire; LR: groupe de risque faible; M0: absence de métastase au diagnostic, M1: présence de métastases au diagnostic, Med: médiastin, Ov: ovaire, RP: rétropéritoine, SC: sacrococcyx, TRD: décès lié au traitement

* Un patient a développé une leucémie aiguë myéloblastique de type 5 secondaire avec t(8; 16) 3 ans après une chimiothérapie à base d'étoposide (VIP) pour progression métastatique.

** Un patient atteint d'une tumeur sacrococcygienne a présenté comme premier événement une leucémie aiguë myéloblastique de type 4 avec del (7q) et inv (16), mais est décédé de sa tumeur germinale après rechute locale.

*** transformation maligne d'une localisation métastatique pulmonaire de tératome en carcinome thyroïdien.

Analyse pronostique

En analyse multivariée sur la population entière (n=239), l'âge ≥ 10 ans ($p=0,0001$), le site tumoral primitif extragonadique ($p=0,005$) et le stade pS1 ($p<0,0001$) étaient significativement associés à un risque accru d'évènement en PFS. Par contre, le niveau d'AFP au diagnostic n'était pas associé à la PFS ($p=0,45$) (**Tableau 4**). Les patients âgés de 10 ans et plus atteints de tumeurs extragonadiques ou testiculaires avaient la PFS la plus basse avec une survie sans progression à 5 ans de 69% et 71%, respectivement (**Tableau 5**). Après restriction aux patients traités dans les groupes IR et HiR, seul l'âge ≥ 10 ans était associée de manière significative à la PFS ($p=0,03$), tandis que l'association avec le site tumoral primitif devenait marginale ($p=0,06$) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Analyse pronostique de la survie sans progression (PFS) à l'aide d'un modèle de Cox multivarié (i) sur l'ensemble de la population (n=239) et (ii) restreinte aux patients traités dans les groupes de risque intermédiaire (IR) ou élevé (HiR) (n=179).

Risk factors	Whole population (n=239, 35 events)	IR and HiR groups (n=179, 20 events)
HR (95%CI) p-value		
Age	p= 0.0001	p= 0.03
<10years	1	1
≥10years	4.6 (2.1-10.1)	3.7 (1.1-12.4)
Primary tumor site	p= 0.005	p= 0.06
Testis	1	1
Ovary	1.4 (0.6-3.8)	0.2 (0.05-1.0)
Extragenital	6.3 (2.0-19.9)	1.3 (0.4-4.9)
Extent of disease	p< 0.0001	p= 0.35
pS1 tumors	1	-
Loco-regional	0.09 (0.03-0.3)	1
Metastatic	0.2 (0.05-0.6)	1.5 (0.6-3.9)
AFP level at diagnosis	p= 0.45	p= 0.82
<10,000ng/ml	1	1
≥10,000ng/ml*	0.7 (0.3-1.7)	0.9 (0.3-2.4)

HR: Hazard ratio, CI: intervalle de confiance

* Le taux d'AFP au diagnostic était ≥ 10.000 ng/ml chez 88 patients: 1 dans le groupe LR, 5 dans le groupe IR et 82 dans le groupe HiR.

Tableau 5 : Taux de survie sans progression (PFS) et de survie globale (OS) à cinq ans en fonction de l'âge au moment du diagnostic et des sites tumoraux primitifs pour l'ensemble de la population (n=239, 35 événements, 17 décès).

Age at diagnosis	Primary tumor site	5-y PFS (95%CI)	5-y OS (95%CI)
<10 years			
	Testis (n=42)	90% (77-96)	100%
	Ovary (n=19)	89% (67-97)	94% (73-99)
	Extragenadal (n=85)*	87% (78-93)	93% (85-97)
≥10 years			
	Testis (n=24)	71% (51-85)	87% (68-96)
	Ovary (n=58)	86% (74-93)	92% (82-97)
	Extragenadal (n=11)**	69% (38-89)	78% (45-94)

CI: intervalle de confiance

* Les sites extra gonadiques avant l'âge de 10 ans étaient les suivants: sacro-coccygien (n=57), vaginal (n=10), méditastinal (n=8), rétropéritonéal (n=4) et autre (n=6).

** Les sites extra gonadiques après l'âge de 10 ans étaient les suivants: méditastinal (n=8), rétropéritonéal (n=2) et utérin (n=1).

Valeur pronostique de la décroissance de l'AFP

Parmi les 179 patients inclus dans les groupes IR et HiR, 163 avaient un taux d'AFP élevé avant la première cure de chimiothérapie. Un dosage d'AFP était disponible après la première cure de chimiothérapie pour 151 d'entre eux (93%, 52 IR, 99 HiR, 17 événements, **Tableau 6**). Au total 12 patients (7%) ont été exclus pour absence d'AFP à la seconde cure, dont un patient décédé précocement avant de recevoir la seconde de progression de la maladie et 11 patients (1 événement par progression) sans mesure disponible mais sans profil particulier conduisant à les considérer comme données manquantes complètement aléatoires (*missing completely at random*, MCAR).⁴³ Par conséquent, sous cette hypothèse, l'exclusion de ces patients n'induit pas de biais dans l'estimation de l'effet de la décroissance de l'AFP sur le risque d'évènement. La distribution des valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie et les profils individuels de décroissance de l'AFP ont été rapportés dans les **Figures 2 et 3**. Les valeurs d'AFP avant la première cure de chimiothérapie étaient très variables, de 10 à 400.000 ng/ml (médiane : 7.273) avec 36% des patients ayant un taux entre 10 et 100.000 ng/ml (n=55) et 7% un taux ≥ 100.000 ng/ml (n=10).

Tableau 6 : Caractéristiques des 151 patients inclus dans l'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP.

	Risk groups		Total
	Intermediate risk	High risk	
Number of patients	52	99	151
Females	37 (71%)	73 (74%)	110 (73%)
Age ≥10 years	22 (42%)	42 (42%)	64 (42%)
AFP at diagnosis ≥15,000 ng/ml	-	72 (73%)	72 (48%)
Presence of metastases	-	44 (44%)	44 (29%)
Primary tumor site			
Testis	6 (12%)	12 (12%)	18 (12%)
Ovary	16 (31%)	32 (32%)	48 (32%)
Sacrococcygeal	17 (33%)	35 (35%)	48 (47%)
Mediastinum	4 (12%)	11 (16%)	52 (34%)
Retroperitoneum	3 (6%)	1 (1%)	4 (3%)
Vagina	5 (10%)	3 (3%)	8 (5%)
Other	-	5 (5%)	5 (3%)
Median follow-up (range) (years)	5.9 (0-12)	5.5 (0-14)	5.7 (0-14)
Events for PFS	7	10	17
Progression/ Relapse	5	10	15
Bilateralization	1	-	1
Death	1	-	1
5-years PFS (95%CI)	86% (74-93%)	90% (82-94%)	93% (82-93%)
Deaths	5	6	11
Tumor	4	6	10
2 nd neoplasm	-	-	-
Other causes	1	-	1
5-years OS (95%CI)	92% (81-97%)	94% (87-97%)	93% (88-96%)

CT: chimiothérapie, PFS: survie sans progression, OS: survie globale, CI: intervalle de confiance

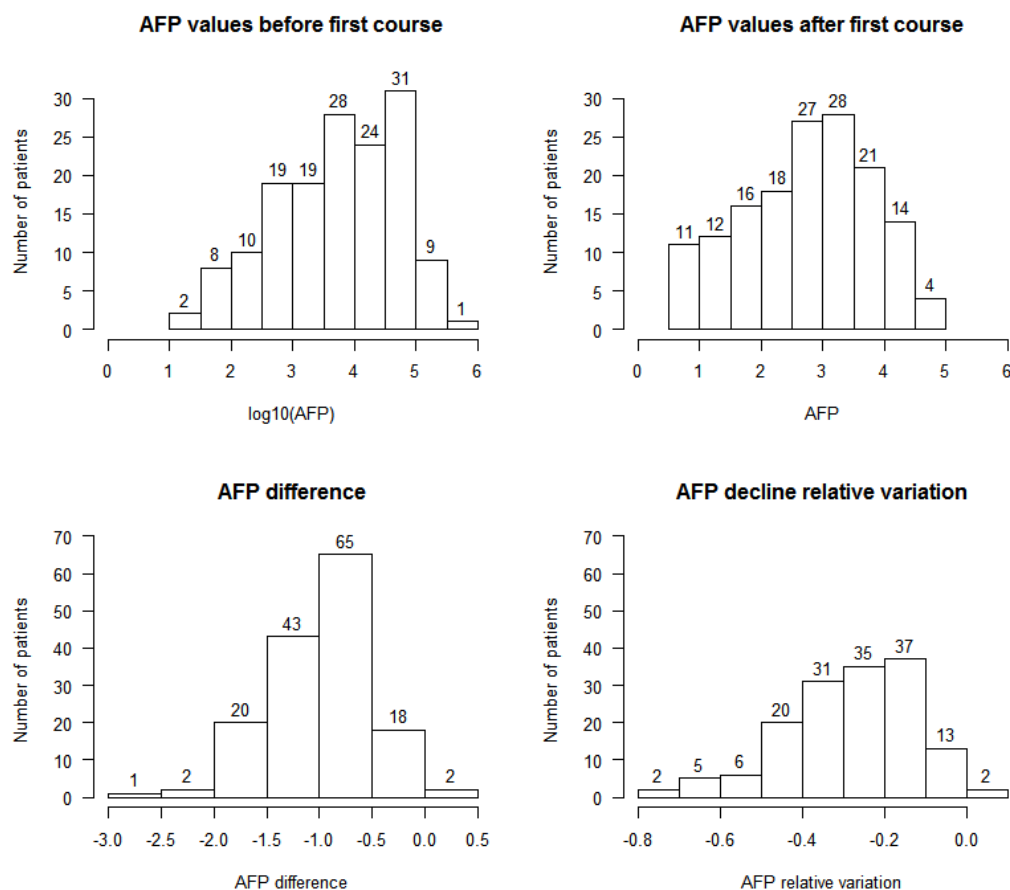


Figure 2 : Histogrammes décrivant la variation de l'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie (n=151).

- (i) Histogrammes des valeurs d'AFP avant la première cure de chimiothérapie (panneau en haut à gauche) ;
- (ii) Histogrammes des valeurs d'AFP après la première cure de chimiothérapie (panneau en haut à droite) ;
- (iii) Histogramme de la différence entre les valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie (panneau en bas à gauche);
- (iv) Histogramme de la variation relative de l'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie (rapport entre la différence entre les valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie et la valeur d'AFP avant la première cure de chimiothérapie) (panneau en bas à droite)

Toutes les valeurs d'AFP ont été transformées à l'aide d'une transformation $\log_{10}$.

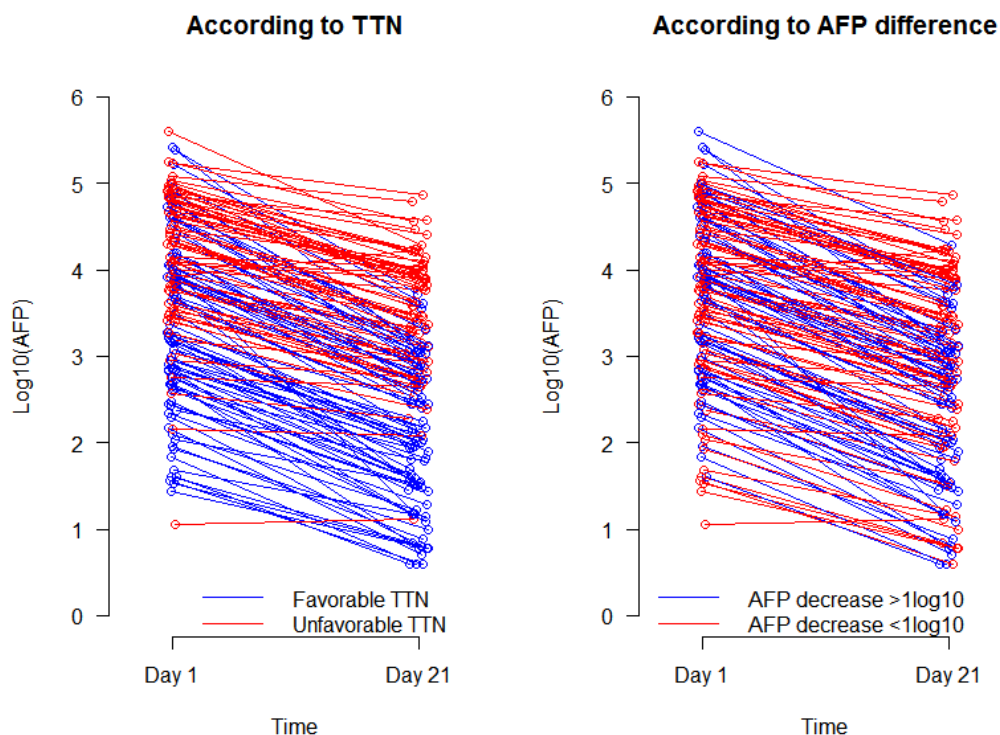


Figure 3 : Profils individuels de décroissance de l'AFP (échelle logarithmique).

Représentation fonction du statut de réponse favorable (bleu) ou défavorable (rouge) défini par :

- (i) le temps théorique de normalisation de l'AFP TTN (panneau de gauche). Une décroissance défavorable a été définie par une augmentation de l'AFP après la première cure de chimiothérapie ou par un TTN ≥ 9 semaines.
- (ii) la variation d'AFP observée (panneau de droite). Une décroissance favorable a été définie par une réduction de l'AFP après la première cure de chimiothérapie d'au moins 1 log10.

Dans l'approche 1, nous avons analysé la valeur pronostique du TTN comme estimateur de la décroissance de l'AFP sous chimiothérapie. En considérant le TTN comme variable continue, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre TTN et PFS, après ajustement sur l'âge au diagnostic, le site tumoral primitif, l'extension de la maladie et le taux initial d'AFP : HR=1.0, IC95%=0.9-1.0, p=0.61 (

Tableau 7). En considérant le TTN comme variable binaire, 70 patients (46%) avaient une décroissance favorable de l'AFP selon la définition établie précédemment. Il n'a pas été retrouvé d'association entre le TTN sous forme binaire et la PFS (HR=0.8, IC95%=0.3-2.2, p=0,68,

Tableau 7).

Il est à noter que le TTN est dépendant de la valeur d'AFP avant la première cure de chimiothérapie (M0). En considérant la décroissance exponentielle de l'AFP selon sa demi-vie ($t_{1/2}$ en jours), la valeur d'AFP après la première cure de chimiothérapie (M1) à J21 est donnée par la formule :

$$M1 = M0 \times 2^{-21/t_{1/2}}$$

En fixant la valeur normale de l'AFP (MN) à 10 ng/ml, et en considérant une demi-vie variable de 4 à 7 jours, nous observons les courbes représentées sur la **Figure 4** pour l'estimation du TTN en fonction de M0. Il apparaît que quelle que soit la demi-vie considérée, de 4 à 7 jours, le TTN estimé devient supérieur à 9 semaines pour des valeurs de M0 variant de 512 à 55.109 ng/ml. Or dans notre population d'analyse, 27/151 patients (18%) ont un taux d'AFP > 55.109 ng/ml avant la première cure de chimiothérapie. La probabilité que ces patients aient une réponse favorable est dès lors très faible. Ceci se vérifie par le fait que seulement 8 d'entre eux (30%) ont un TTN < 9 semaines.

Au total l'utilisation du TTN dans notre population d'étude caractérisée par un nombre important de patients ayant des valeurs initiales d'AFP très élevées conduit à une surreprésentation de patients considérés comme ayant une réponse défavorable du fait même de la valeur initialement très élevée de l'AFP. Ce type de modélisation pénalise les patients ayant une valeur élevée de marqueurs avant la première cure de chimiothérapie. Ceci est bien illustré par la figure 3 qui montre une proportion croissante de patients ayant une réponse défavorable quand la valeur d'AFP M0 augmente.

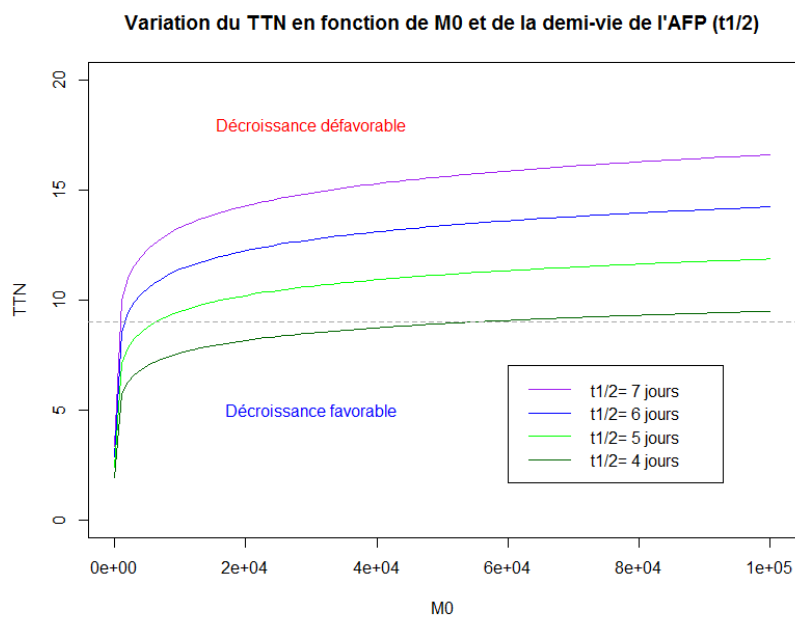


Figure 4 : Temps théorique de normalisation de l'AFP (TTN) en fonction de la valeur observée d'AFP avant la première cure de chimiothérapie (M_0) et de la valeur calculée d'AFP à J21 à partir d'un modèle de décroissance exponentielle à demi-vie variable de 4 à 7 jours.

Dans l'approche 2, nous avons étudié la variation absolue de l'AFP entre avant et après la première cure de chimiothérapie. Nous avons observé que le risque de progression/rechute augmentait de manière marginale lorsque la réduction de l'AFP à J21 était faible, après ajustement sur l'âge au diagnostic, le site tumoral primitif, l'extension de la maladie et le taux initial d'AFP : HR=2,6, IC95%=0,8-8,4, p=0,10 (**Tableau 7**). En considérant une réduction de l'AFP de moins de 1log10 comme réponse défavorable, 85 patients (56%) avaient une décroissance défavorable de l'AFP. Une décroissance défavorable était également marginalement associée à un risque accru de progression/rechute (HR=3.0, IC95%=0.9-10.3, p=0.08).

Dans l'approche 3, nous avons étudié la différence entre les AUC de décroissance de l'AFP observée et attendue. Nous avons observé un risque significativement accru de progression/rechute en cas de majoration de l'écart entre AUC observée et AUC attendue (témoignant d'une décroissance observée plus lente par rapport à l'attendue) après ajustement sur l'âge au diagnostic, le site tumoral primitif et l'extension de la maladie : HR=2,1, IC95%=1,0-4,2, p=0,05 (**Tableau 7**).

Le modèle correspondant à l'approche 3 (AUC) apparaît être le mieux ajusté aux données (critère d'Akaike, AIC=157.8). Cependant, la différence d'AIC avec les modèles des approches 1 et 2 est faible (**Tableau 7**), de même qu'avec le modèle n'intégrant pas la décroissance de l'AFP (AIC=162.3).

La capacité de discrimination des modèles pronostiques de décroissance de l'AFP correspondant aux différentes approches testées ont été évaluées à l'aide de la statistique c de Uno et des courbes ROC aux temps 0.5, 1 et 1.5 ans (**Figure 5**). Les résultats sont relativement similaires en terme de discrimination avec une statistique c variant de 0.71 (approche 1) à 0.74 (approche 2) et des courbes ROC variant peu d'une approche à l'autre quel que soit le temps

considéré. Comparativement au modèle pronostique n'intégrant pas la décroissance de l'AFP, le gain en terme de capacité de discrimination reste néanmoins faible (statistique c du modèle pronostique sans la décroissance de l'AFP=0.71).

Tableau 7 : Analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP sur la survie sans progression (PFS).

Ont été inclus dans cette analyse les patients traités dans les groupes de risque intermédiaire et élevé avec une sécrétion élevée d'AFP avant la première cure de chimiothérapie et un dosage d'AFP disponible après la première cure de chimiothérapie (n=151 patients, 17 événements). Trois modélisations de la décroissance de l'AFP ont été utilisées. L'analyse a été ajustée sur l'âge au diagnostic, le site tumoral primitif et l'extension de la maladie au diagnostic.

Risk factors	Approach 1 ¹		Approach 2 ²	Approach 3 ³
	TTN (quantitative)	TTN (binary)	change	(O – E) AUC
HR (95%CI) p-value				
Age	p=0.04	p=0.03	p=0.05	0.04
<10years	1	1	1	1
≥10years	3.8 (1.1-13.4)	3.9 (1.1-13.6)	3.5 (1.0-12.7)	3.6 (1.1-12.4)
Primary tumor site	p=0.08	p=0.07	p=0.09	0.08
Testis	1	1	1	1
Ovary	0.2 (0.03-1.1)	0.2 (0.03-1.1)	0.2 (0.04-1.1)	0.2 (0.04-1.1)
Extragenital	1.3 (0.3-5.1)	1.3 (0.3-5.3)	1.3 (0.3-5.1)	1.3 (0.3-5.4)
Extent of disease	p=0.68	p=0.72	p=0.43	0.39
pS1 tumors	-	-	-	-
Loco-regional	1	1	1	1
Metastatic	1.2 (0.5-3.3)	1.2 (0.4-3.3)	1.5 (0.5-4.1)	1.5 (0.6-4.2)
AFP level at diagnosis	p=0.98	p=0.92	p=0.95	
<10,000ng/ml	1	1	1	
≥10,000ng/ml	1.0 (0.3-3.1)	0.9 (0.3-2.8)	1.0 (0.3-2.7)	
AFP decline	p=0.61**	p=0.68	p=0.10	0.05
	1.0 (0.9-1.0)	0.8 (0.3-2.2) §	2.6 (0.8-8.4)	2.1 (1.0-4.2)
AIC⁺	156.55	162.80	160.38	157.80

TTN: temps théorique de normalisation de l'AFP, HR: Hazard ratio, CI: intervalle de confiance, ⁺: critère d'Akaike

¹: Méthode 1: temps théorique de normalisation de l'AFP (TTN) considéré comme variable quantitative ou binaire (décroissance favorable=valeur AFP normalisée après la première cure de chimiothérapie ou TTN <9 semaines; décroissance défavorable=AFP en augmentation après une cure de chimiothérapie ou TTN ≥ 9 semaines), avec ajustement sur le taux d'AFP au diagnostic (<, ≥ 10 000).²⁶

²: Méthode 2: différence entre les valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie, avec ajustement sur le taux d'AFP au diagnostic (<, ≥ 10 000).

³: Méthode 3: différence entre les aires sous la courbe (AUC) de décroissance de l'AFP observées (définies par les valeurs d'AFP avant et après la première cure de chimiothérapie) et attendues (définies par la valeur d'AFP avant la première cure de chimiothérapie et la valeur estimée d'AFP après la première cure de chimiothérapie calculée selon une formule de décroissance exponentielle avec demi-vie fixée à 7 jours).

§ correspond au HR avec une décroissance favorable comme référence.

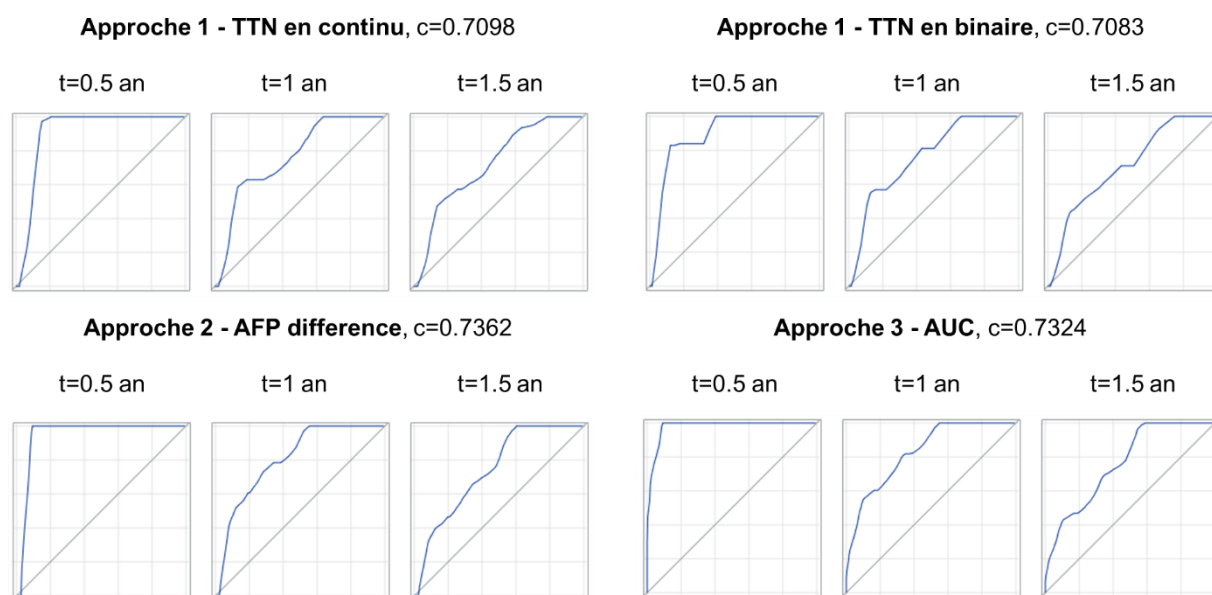


Figure 5 : Evaluation de la capacité de discrimination des différents modèles pronostiques de décroissance de l'AFP à l'aide de la statistique c de Uno (calculée au temps maximal de survenue d'un évènement soit 1.91 an) et des courbes ROC tracées aux temps 0.5, 1 et 1.5 ans.

DISCUSSION

En utilisant dans l'étude TGM95 une chimiothérapie à base de cisplatine et une stratification thérapeutique fonction de la qualité de la résection initiale, du niveau d'AFP au diagnostic et du statut métastatique, nous avons observé d'excellents résultats en termes de survie avec une PFS et une OS à 5 ans supérieures à 85%. Nous avons confirmé que l'âge au diagnostic et le site de la tumeur primitive étaient des facteurs pronostiques indépendants. Nous avons également montré que le niveau d'AFP au diagnostic et le statut métastatique n'étaient plus associés à la PFS après stratification thérapeutique sur ces caractéristiques. De plus, contrairement aux études menées dans les TGM de l'adulte, nous n'avons pas identifié de valeur pronostique significative de la décroissance de l'AFP selon le TTN. Par contre nous avons mis en évidence que d'autres modélisations de la décroissance de l'AFP pouvaient être utiles pour analyser sa valeur pronostique, en particulier du fait de l'importante variabilité des valeurs initiales d'AFP et de la fréquence des valeurs très élevées. En particulier, nous avons montré qu'une faible diminution de l'AFP après une cure de chimiothérapie (notamment inférieure à $1\log_{10}$) et une décroissance observée plus lente par rapport à l'attendue (augmentation de l'écart entre les AUC observée et attendue) étaient associées de manière marginale et significative, respectivement, à un risque accru de progression/rechute.

Dans le groupe de bas risque (tumeurs localisées et complètement réséquées), une stratégie attentiste a été adoptée, permettant d'éviter la chimiothérapie à 79% des patients atteints de TGM-NS gonadiques. Ces résultats confirment les données publiées précédemment en faveur d'une observation simple après une chirurgie initiale complète pour un TGM-NS gonadique localisée chez l'enfant.⁴⁴⁻⁴⁶

Dans le groupe de risque intermédiaire, nous avons utilisé une chimiothérapie de type VBP avec une survie sans progression à 5 ans de 87% (IC95%=77-93%). Ce schéma thérapeutique

a été choisi pour éviter l'ifosfamide et sa toxicité rénale, ainsi que le VP16 et son effet leucémogène.^{47,48} De plus, la bléomycine a été administrée à la dose de 30 mg/m² par cycle, soit une dose 2 fois plus faible que dans la chimiothérapie classique de l'adulte de type BEP (bléomycine-étoposide-cisplatine).⁴⁹ Le groupe américain d'oncologie pédiatrique a proposé un autre schéma pédiatrique (PEb), similaire au BEP mais avec une dose réduite de bléomycine (15 mg/m² par cycle).⁵⁰ D'autres groupes ont utilisé l'association étoposide-cisplatine, supprimant ainsi la bléomycine. Une étude randomisée portant sur les TGM testiculaires de risque intermédiaire de l'adulte a montré l'équivalence d'efficacité entre 4 cycles d'étoposide-cisplatine et 3 cycles de BEP.⁵¹⁻⁵³ Contrairement à la chimiothérapie de type VBP utilisée par le groupe français, tous ces schémas sont basés sur l'étoposide, qui expose potentiellement les patients au risque de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) secondaire. Dans notre série, deux LAM sont survenues après le traitement par VIP à base d'étoposide.

Dans le groupe de risque élevé, le schéma thérapeutique de type VIP a été choisi pour associer les médicaments connus comme les plus efficaces dans cette maladie, l'ifosfamide, l'étoposide et le cisplatine, avec une excellente efficacité (PFS à 5 ans=89%, IC95%=82-94%). Ce schéma thérapeutique a été préféré au BEP pour réduire le risque de fibrose pulmonaire toxique liée à la bléomycine, en particulier dans les localisations médiastinales, malgré une hémato-toxicité plus élevée.^{54,55} Le groupe allemand MAKEI et le groupe brésilien ont également choisi le PEI (équivalent au VIP) qui évite les fortes doses de bléomycine chez ces patients à haut risque.⁵⁶

L'analyse pronostique réalisée dans le cadre de cette étude TGM95 a identifié deux facteurs de mauvais pronostiques: l'âge ≥ 10 ans et le site tumoral primitif extragonadique. L'âge ≥ 10 ans est corrélé avec la survenue de TGM mixtes et son caractère pronostique péjoratif a déjà été mis en évidence, en particulier dans les sites extragonadiques.⁵⁷ Dans notre série, les patients présentant une tumeur de localisation extragonadique avaient une PFS à 5 ans de 69% après l'âge de 10 ans, contre 87% avant 10 ans. Ces résultats sont similaires à ceux de l'analyse

multivariée réalisée sur 519 patients atteints de TGM-NS inclus dans la base de données internationale MaGIC, dans laquelle les patients âgés de 11 ans ou plus présentant des tumeurs extragonadiques avec extension locorégionale ou métastatique ou des tumeurs ovariennes métastatiques avaient une survie à long terme prédite <70 %.²⁵ Cependant, contrairement à l'analyse de MaGIC, nous n'avons pas retrouvé le caractère pronostique péjoratif du statut métastatique. Cela pourrait s'expliquer par la stratification thérapeutique utilisée dans l'étude TGM95 réservant aux patients atteints de métastases donc à plus haut risque de récurrence selon les résultats des études françaises précédentes, une chimiothérapie plus intensive et plus longue.

Un point important de notre étude, qui n'avait jusqu'à présent pas été étudié dans les TGM pédiatriques, est l'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP, facteur pronostique important chez les adultes atteints de TGM de haut risque et dorénavant déjà utilisé chez ces patients pour l'adaptation précoce du traitement à la réponse.²⁶⁻²⁸ Contrairement aux études publiées chez l'adulte, nos résultats ne montrent aucune valeur pronostique significative de la décroissance de l'AFP modélisée selon le temps théorique de normalisation de l'AFP (TTN), que la variable soit continue ou binaire. Une explication réside dans la grande proportion de patients avec un taux d'AFP ≥ 10.000 ng/ml (48% dans notre série contre 5% dans l'étude de Fizazi), conduisant à une surreprésentation de patients considérés comme ayant une réponse défavorable du fait même de la valeur initialement très élevée de l'AFP. Ce type de modélisation pénalisant les patients ayant une valeur initiale élevée de marqueurs nous avons testé d'autres approches. Nous avons ainsi pu identifier un risque accru de progression/rechute en cas de décroissance lente de l'AFP, et en particulier une PFS significativement réduite en cas d'augmentation de l'écart entre décroissances observée et attendue. Cette modélisation de la décroissance sous forme de différence d'AUC pourrait être un marqueur pronostique intéressant pour une adaptation précoce du traitement dans les TGM-NS pédiatriques. Cependant le faible gain en terme de capacité de discrimination et d'AIC observé lors de

l'intégration de la décroissance de l'AFP dans le modèle pronostique général, nécessite de nuancer ces résultats et encourage à la réalisation d'une analyse plus large intégrant d'autres essais.

Cette étude a plusieurs limites. Tout d'abord, du fait du faible nombre d'événements observés, la puissance de cette étude reste limitée. La puissance de l'analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP (n=17 événements) calculée a posteriori vaut 29.3% et 11.0% pour l'approche 1 avec TTN continu et binaire, respectivement, 52.2% pour l'approche 2 (AFP *difference*) et 78.8% pour l'approche 3 (AUC). Ce calcul de puissance a été effectué en utilisant la méthode décrite dans l'article de Hsieh.⁵⁸ Il s'agit d'une puissance maximale puisque nous n'avons pas pris en considération de facteur d'inflation traduisant la corrélation entre la décroissance de l'AFP et les autres variables pronostiques d'ajustement. De plus aucune étude de validation interne ni d'analyses en sous-groupes n'a pu être réalisée. Ensuite, le nombre de cures de chimiothérapie a été adapté à la réponse et des intensifications ont été réalisées en cas de réponse insuffisante et notamment en cas de non-normalisation des marqueurs après 3 ou 4 cures de chimiothérapie. Par conséquent, les patients ayant une réponse défavorable, avec une décroissance lente des marqueurs, ont été traités avec une chimiothérapie plus intensive et prolongée, ce qui a pu biaiser l'estimation de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP. Dans cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP dans des protocoles comportant un nombre fixe de cures.

En conclusion, nous pensons que ces travaux méritent d'être approfondis par une analyse de la valeur pronostique de la décroissance de l'AFP sur une base de données plus large. Pour ce faire, nous avons proposé la réalisation d'une méta-analyse d'essais cliniques portant sur les TGM-NS de l'enfant. Un consortium transatlantique a été créé et un protocole d'analyse rédigé (Annexe 2). L'étude devrait pouvoir débuter courant d'année 2020.

PARTIE 2 :

Facteurs constitutionnels associés à l'efficacité ou à la toxicité
des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie

PARTIE 2 : Facteurs constitutionnels associés à l'efficacité ou à la toxicité des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie, études d'interaction sexe x traitement et analyses pharmacogénétiques

I- Evaluation de l'effet du sexe masculin/féminin sur l'efficacité et la toxicité des agents alkylants

INTRODUCTION

Les sarcomes osseux (ostéosarcome et sarcomes d'Ewing) sont des tumeurs solides malignes se développant principalement chez les adolescents et jeunes adultes. Dans la catégorie d'âge 15-24 ans, ils représentent environ 8% des cancers.² Ce sont les tumeurs solides malignes extra cérébrales les plus fréquentes après les lymphomes, les tumeurs germinales malignes et les cancers de la thyroïde.² Les sarcomes d'Ewing touchent le plus souvent les os plats (bassin, côtes) mais peuvent également se développer à partir d'os longs (fémur, tibia, péroné et humérus principalement). Leur pronostic dépend essentiellement du statut localisé ou métastatique et de la réponse histologique à la chimiothérapie première (ou pour les patients non opérés après chimiothérapie première, du volume initial de la tumeur).⁵⁹ La réponse histologique est définie par le pourcentage de cellules résiduelles viables dans la pièce de résection chirurgicale de la tumeur primitive. Un pourcentage de cellules résiduelles supérieur à 10% est un facteur pronostic péjoratif. Le pronostic global de ces patients atteints de sarcome d'Ewing reste très réservé avec des taux de survie autour de 30% en cas de maladie métastatique, 60% en cas de maladie localisée avec mauvaise réponse histologique et 75% en cas de maladie localisée avec bonne réponse histologique.⁶⁰⁻⁶² La stratégie thérapeutique

recommandée aujourd'hui associe une chimiothérapie première, un traitement local de la tumeur primitive après chimiothérapie par chirurgie et/ou radiothérapie, un traitement par chimiothérapie d'entretien. En cas de métastases extra pulmonaires ou de maladie localisée avec mauvais réponse histologique, une intensification thérapeutique est recommandée (**Figure 6**).

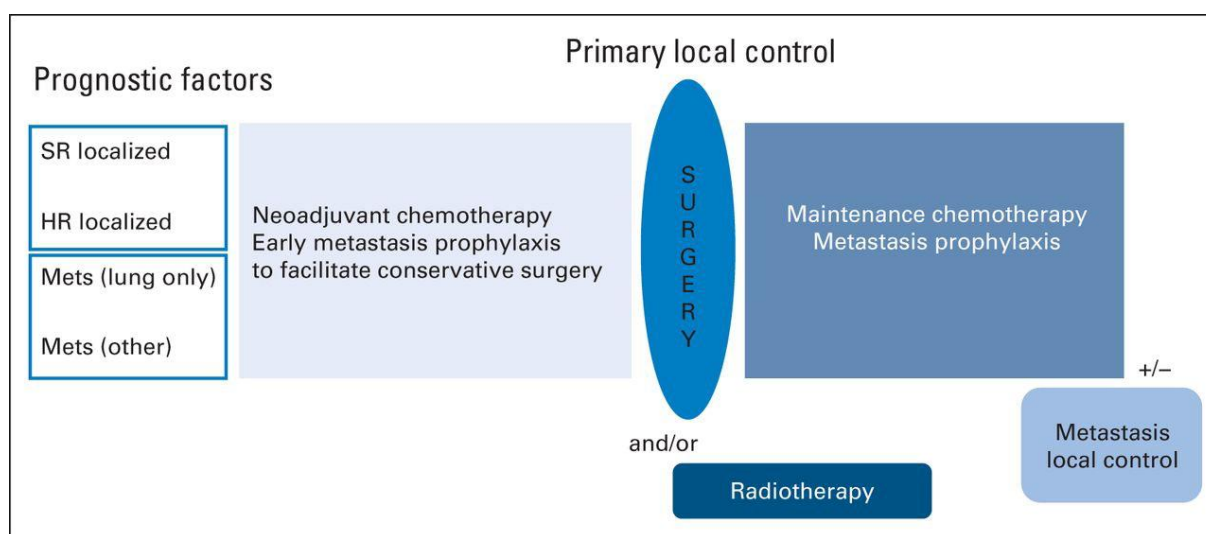


Figure 6 : Représentation schématique de la stratégie thérapeutique utilisée en traitement du sarcome d'Ewing.

HR, maladies de haut risque; Mets, métastases; SR, maladie de risque standard. Figure empruntée à l'article de Gaspar et al, JCO, 2015.⁵⁹

Dans le dernier essai randomisé européen de non-infériorité Euro-E.W.I.N.G.99-R1 (EE99-R1, NCT00020566), l'efficacité du cyclophosphamide (bras expérimental) a été comparée à celle de l'ifosfamide (bras contrôle) en association avec la vincristine et l'actinomycine (chimiothérapie de type VAC vs. VAI) en traitement d'entretien des sarcomes d'Ewing localisés de risque standard.⁶³ Dans cet essai, 856 patients ont été inclus entre février 2000 et mars 2010 (431 dans le groupe VAC et 425 dans le groupe VAI). Avec un suivi médian de 5,9 ans, les

taux de survie sans événement observés à 3 ans étaient de 75,4% et 78,2% dans les groupes VAC et VAI, respectivement (Hazard Ratio VAC/VAI =1,12, IC91,4%=0,89-1,41). La différence observée de 2.8% en faveur du groupe VAI n'était pas significative (IC91.4%=-7.8-2.2%). Il fut donc conclu à la non-infériorité du cyclophosphamide comparativement à l'ifosfamide. La toxicité hématologique (thrombopénie) était supérieure dans le bras VAC (45% vs. 35%), tandis que la toxicité rénale (tubulaire) était supérieure dans le bras VAI (16% vs. 31%). De plus, il été mis en évidence une modification marginale d'efficacité en fonction du sexe : chez les hommes, la chimiothérapie de type VAC était associé à une survie sans événement plus faible que dans le groupe VAI (HR VAC/VAI=1,34, IC95%=0,96-1,86), tandis que la chimiothérapie de type VAC était associé à une survie sans événement légèrement supérieure chez les femmes (HR=0,83, IC95%=0,54-1,28) (p-value du test d'interaction sexe*traitement =0,083).⁶³

De précédentes études avaient déjà rapporté des taux de survie différents en fonction du sexe avec globalement un pronostic plus sombre chez les hommes.⁶⁴⁻⁷⁰ Des différences de toxicité ont également été observées en fonction du sexe, en particulier pour les chimiothérapies à base d'alkylants, avec notamment des toxicités hématologiques plus fréquentes chez les femmes.⁷¹⁻⁷⁵ Certaines de ces observations peuvent être expliquées par des différences de pharmacocinétique entre hommes et femmes (par exemple, une expression différente des enzymes hépatiques intervenant dans le métabolisme de certains médicaments), ce qui a conduit certains auteurs à proposer des adaptations de posologie basées sur le sexe.⁷⁶⁻⁷⁹

Cependant, aucune interaction entre le type d'agent alkylant (cyclophosphamide ou ifosfamide) et le sexe n'avait été rapportée avant l'étude EE99-R1. De façon à mieux explorer cette hypothèse, nous avons réalisé une méta-analyse d'essais cliniques contrôlés randomisés comparant le cyclophosphamide et l'ifosfamide dont nous rapportons ici les résultats (étude MAIAGE). Ce travail a été publié dans *Pediatric Blood and Cancer* en 2017 (Annexe 3).

PATIENTS ET MÉTHODES

Procédure de sélection des essais cliniques

La première étape a consisté en une recherche bibliographique visant à identifier les essais cliniques randomisés, ayant comparé le cyclophosphamide et l'ifosfamide, sans restriction sur l'âge du patient ni le type de cancer. La recherche a été faite dans les bases de données *PubMed* et *The Cochrane Library* (articles publiés entre 1980 et 2016, sans restriction de langage) ainsi que dans le registre des essais cliniques du *National Institute of Health* (<https://clinicaltrials.gov/>). La recherche bibliographique a utilisé les termes suivants: pour PubMed, "Ifosfamide"[Mesh] AND "Cyclophosphamide"[Mesh] AND ("Randomized Controlled Trial" [Publication Type] OR "Controlled Clinical Trial" [Publication Type]), pour Cochrane Library, "Ifosfamide" AND "Cyclophosphamide", et pour le registre des essais cliniques du NIH (<http://www.clinicaltrials.gov>) "Ifosfamide" AND "Cyclophosphamide". En outre, les investigateurs participants à la méta-analyse ont été invités à signaler tout essai dont ils auraient eu connaissance et qui n'aurait pas été identifiée par la recherche bibliographique précédemment décrite. La sélection des essais a été effectuée par deux co-auteurs (Brice Fresneau et Gwénaél Le Teuff) et tous les articles pertinents ont été examinés par un troisième (Marie-Cécile Le Deley).

Les essais cliniques randomisés sélectionnés pouvaient évaluer le cyclophosphamide et l'ifosfamide en monothérapie ou évaluer des combinaisons thérapeutiques mais dans ce dernier cas la randomisation devait porter exclusivement sur l'agent alkylant, les autres chimiothérapies devant être identiques dans les deux bras de randomisation. La posologie et la durée de perfusion de l'agent alkylant (cyclophosphamide ou ifosfamide) n'étaient pas fixées. Etaient exclus les essais cliniques randomisant cyclophosphamide et ifosfamide pour une seule cure

ainsi que les essais pour lesquels les données individuelles concernant la survie et la toxicité n'étaient pas disponibles.

Extraction de données

Les données individuelles ont été collectées pour chaque essai: sexe, date de naissance, date de randomisation, traitement attribué, date du premier événement, type du premier événement (progression, rechute, cancer secondaire, décès), date de dernières nouvelles, statut vital aux dernières nouvelles, date de décès et cause de décès (le cas échéant). Nous avons également collecté des données de toxicité aiguë pour les toxicités suivantes : hématologiques (leucopénie/neutropénie, thrombopénie), infectieuse, muqueuse (mucite, diarrhée), rénale, hépatique, cardiaque, cutanée, neurologique centrale et neurologique périphérique. Les données de toxicité ont été recueillies pour la période d'administration de la chimiothérapie randomisée soit sous forme de mesures répétées après chaque cure de chimiothérapie randomisée, soit si cette information n'était pas disponible de manière globale sous forme d'une variable résumant l'information pour l'ensemble des cures de chimiothérapie randomisées. Le grade de toxicité était recueilli selon la classification *NCI-CTCAE*. Les données individuelles anonymisées ont été collectées de manière centralisée dans le service de biostatistiques de Gustave Roussy.

Evaluation de la qualité des essais

Les données ont été vérifiées selon une procédure standardisée. Les valeurs manquantes et les divergences observées entre données transmises et données publiées ont été discutées avec les responsables des essais.

La qualité de la randomisation a été évaluée en vérifiant :

- (i) l'équilibre de la randomisation dans le temps (les courbes représentant le nombre cumulé de patients inclus au cours du temps ont été tracées et comparées entre les bras de randomisation),
- (ii) la comparabilité des caractéristiques de base des patients entre les groupes de traitement.

Le suivi des patients a également été comparé entre les groupes de traitement (courbes de suivi réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier inversée telle que décrite par Schemper⁸⁰, considérant comme évènement l'arrêt du suivi par perte de vue et comme censure le décès).

Chaque essai a ensuite été ré-analysé pour les critères d'efficacité et de toxicité et les analyses ont été envoyées aux responsables de chaque essai pour validation. Enfin la définition de la population a été revue pour chaque essai afin de réaliser la méta-analyse en intention de traiter.

Analyses statistiques

a- Analyses d'efficacité

Critères d'évaluation

Le critère d'évaluation principal était la survie sans progression (PFS), définie comme l'intervalle de temps entre la date de randomisation et la date du premier évènement observé (progression, récurrence ou décès quelle qu'en soit la cause) ou en l'absence d'évènement, la date de dernières nouvelles. Le second critère d'évaluation était la survie globale (OS), définie comme l'intervalle de temps entre la date de randomisation et la date de décès, quelle qu'en soit la cause, ou pour les patients vivants aux dernières nouvelles, la date de dernières nouvelles. Les analyses ont été effectuées en intention de traiter.

Modèle statistique principal et étude de l'hétérogénéité inter-essais

L'effet du traitement selon le sexe a été estimé par un terme d'interaction sexe * traitement dans un modèle de Cox multivarié, stratifié sur l'essai et le sexe, et incluant le traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) et l'âge comme effets fixes principaux. L'âge a été considéré comme une variable catégorielle à 3 catégories (<12, [12-18] et > 18 ans) avec des seuils correspondant à ceux définissant les différents états pubertaires (état pré-pubertaire, en cours de puberté et post-pubertaire). Le sexe a été considéré comme variable de stratification et non d'ajustement bien qu'il n'y ait pas d'écart à la proportionnalité pour cette variable (test de Grambsch et Therneau⁸¹), pour conserver une modélisation identique à celle utilisée dans l'analyse princeps EE99-R1⁶³. Le rapport de risque (Hazard Ratio HR) de la variable d'interaction a pu être estimée directement dans le modèle permettant ainsi en une seule étape de quantifier un effet commun à différents essais inclus dans la méta-analyse (OSM, « *one-stage model* »).⁸²

Cette méthode suppose une homogénéité de l'effet entre les essais. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test d'homogénéité, le test Q de Cochran.⁸³ Ce test est réalisé en sommant les carrés des écarts entre les effets de chaque essai et l'effet global, les effets de chaque essai étant pondérés par la contribution relative de chacun à la méta-analyse (pondération par l'inverse de la variance de l'essai).

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i (T_i - \bar{T})^2$$

Où T_i est l'effet estimé pour l'essai i , $\bar{T}$ l'effet global calculé à partir des effets estimés pour chaque essai et pondérés par l'inverse de leur variance w_i .

$$\bar{T} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i T_i}{\sum_{i=1}^k w_i}$$

La statistique Q suit une distribution du Chi-2 à k-1 degrés de liberté où k est le nombre d'essais inclus dans la méta-analyse.

Considérant le faible nombre d'essais inclus dans la méta-analyse, l'hétérogénéité entre les essais a également été évaluée par l'index I^2 de Higgins et Thompson.⁸⁴ L'index I^2 quantifie la proportion d'hétérogénéité inter-essais « vraie » en divisant la différence entre la statistique Q et son nombre de degrés de liberté (k-1) par la statistique Q elle-même :

$$I^2 = \begin{cases} \frac{Q - (k - 1)}{Q} \times 100\% & \text{si } Q > (k - 1) \\ 0 & \text{si } Q \leq (k - 1) \end{cases}$$

Un index I^2 égal à 0 signifie que la totalité de la variabilité de la taille de l'effet observée entre les essais est d'origine aléatoire (effet d'échantillonnage), tandis qu'un I^2 égal par exemple à 50 signifie que la moitié de la variabilité de la taille de l'effet observée entre les essais n'est pas aléatoire mais liée à une hétérogénéité vraie entre les essais.

Analyses de sensibilité

Plusieurs analyses de sensibilité ont été effectuées:

- (i) ajout d'une composante aléatoire spécifique à l'étude pour estimer l'effet du traitement dans la méthode à une étape (OSM à effets aléatoires) de façon à prendre en considération la variabilité inter-essais de l'effet du traitement pouvant retentir sur l'estimation de l'interaction sexe * traitement (hétérogénéité selon l'essai);
- (ii) modification de la variable âge au diagnostic considérée comme variable continue et non plus catégorielle dans l'OSM de façon à évaluer l'impact d'une potentielle erreur de spécification de l'âge (OSM à effets fixes avec âge en continu);
- (iii) utilisation d'une approche «en deux étapes», consistant dans un premier temps à estimer les termes d'interaction indépendamment pour chaque essai à l'aide de

modèles de Cox multivariés, puis dans un second temps à les combiner par la méthode de l'inverse de la variance pour estimer un terme d'interaction unique pour les différents essais (méthode PWT, « *pooling within-trial covariate interactions* »).⁸²

Ces différentes approches statistiques (OSM et analyses de sensibilités) ont été appliquées à l'échantillon de validation (essais randomisés inclus dans la méta-analyse autres que EE99-R1, « *validation set* ») puis à l'ensemble des essais de la méta-analyse, incluant EE99-R1 (« *pooled analysis* »).

Les courbes de PFS ont été réalisées selon la méthode de Peto à partir des HR de l'effet traitement par sexe estimés par un modèle de Cox stratifié sur l'essai et appliqué à l'ensemble des essais inclus dans la méta-analyse incluant EE99-R1. Ces courbes ont été utilisées pour calculer la différence absolue de PFS à 5 ans entre les différents groupes définis par le type d'agent alkylant et le sexe.⁸⁵

Pour explorer l'hétérogénéité du terme d'interaction sexe * traitement commun à tous les essais inclus dans la méta-analyse en fonction des catégories d'âge, un terme d'interaction d'ordre 3 a été inclus dans le modèle entre sexe, traitement et âge, avec les termes d'interactions d'ordre 2 correspondants (sexe*traitement, traitement*âge et sexe*âge).

b- Analyses de toxicité

Pour chaque type de toxicité aiguë, le grade maximal observé sur la période randomisée a été calculé pour chaque patient et divisée en deux catégories définissant la survenue ou non d'au moins une toxicité sévère sur la période randomisée : toxicité hématologique (pas de toxicité sévère : < grade 4, toxicité sévère : ≥ grade 4), mucite (<, ≥ 3), diarrhée (<, ≥ 3), toxicités infectieuses, rénales, hépatiques, cardiaques, cutanées, neurologiques centrales et périphériques

(<, ≥ grade 2). L'analyse de toxicité principale a porté sur les toxicités les plus fréquentes, définies comme survenues chez au moins cinq hommes et femmes dans chaque groupe de randomisation et dans chaque essai, afin de permettre des analyses d'interaction. Les toxicités considérées pour l'analyse principale répondant à ces critères étaient : la toxicité hématologique de type leucopénie/neutropénie, la toxicité infectieuse et la toxicité rénale. Pour chacune de ces toxicités, nous avons estimé le terme d'interaction sexe * traitement à l'aide d'un modèle de régression logistique stratifié sur l'essai et incluant comme covariables l'âge au diagnostic (en 3 catégories), le sexe, le traitement (effets fixes principaux) et le terme d'interaction sexe * traitement. Nous avons évalué l'hétérogénéité de l'interaction entre les essais en estimant un terme d'interaction d'ordre 3 entre sexe, traitement et essai.

Tous les tests réalisés étaient bilatéraux avec un risque de première espèce alpha fixé à 0,05. Les estimations sont données avec des intervalles de confiance à 95% (IC95%). Les logiciels SAS 9.3 et R 3.0.2 ont été utilisés pour les analyses statistiques. Les *packages* Coxme et MetaR ont été utilisés pour réaliser les modèles de Cox à effets aléatoires et les *forest plots*. Les résultats sont rapportés conformément aux recommandations PRISMA-IPD.⁸⁶

RÉSULTATS

Description des essais

En plus de l'essai EE99-R1⁶³, nous avons identifié deux essais cliniques randomisés de phase 3 (EICESS92⁸⁷ et IRS-IV⁸⁸) et un essai randomisé de phase II (essai de l'EORTC sur les sarcomes des tissus mous⁸⁹) sur 380 références d'articles publiés et 37 études enregistrées sur *ClinicalTrials.gov* (**Figure 7**). L'essai de l'EORTC a été exclu car les données relatives à chaque patient (survie et toxicité) n'étaient pas disponibles. Nous avons également exclu trois essais randomisés menés exclusivement chez les femmes (cancer du sein⁹⁰, cancer épithélial de l'ovaire⁹¹ et adénocarcinome de l'endomètre⁹²). En ce qui concerne l'essai IRS-IV comparant trois groupes parallèles, nous avons inclus dans la méta-analyse uniquement les bras VAI (vincristine-actinomycine-ifosfamide) et VAC (vincristine-actinomycine-cyclofosfamide) et exclu le troisième bras (vincristine-ifosfamide-étoposide).

Au total, les trois essais cliniques randomisés inclus dans la méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) sont des essais de phase III comparant en traitement de première ligne des sarcomes le cyclophosphamide à l'ifosfamide en association à d'autres agents de chimiothérapie identiques dans les deux bras de randomisation (**Tableau 8**). Le rapport de dose ifosfamide / cyclophosphamide variait de 4 à 5. Le sexe était considéré comme une variable de stratification dans ces trois essais. Au total, 1528 patients ont été inclus, dont 773 dans le groupe cyclophosphamide et 755 dans le groupe ifosfamide. L'essai EE99-R1 représentait 56% du nombre total de patients. Ces essais ont tous été menés dans des sarcomes (sarcome d'Ewing, rhabdomyosarcome et sarcomes indifférenciés). Ils incluaient des enfants, des adolescents et des jeunes adultes âgés de moins de 15 ans chez 66% des patients (**Tableau 9**).

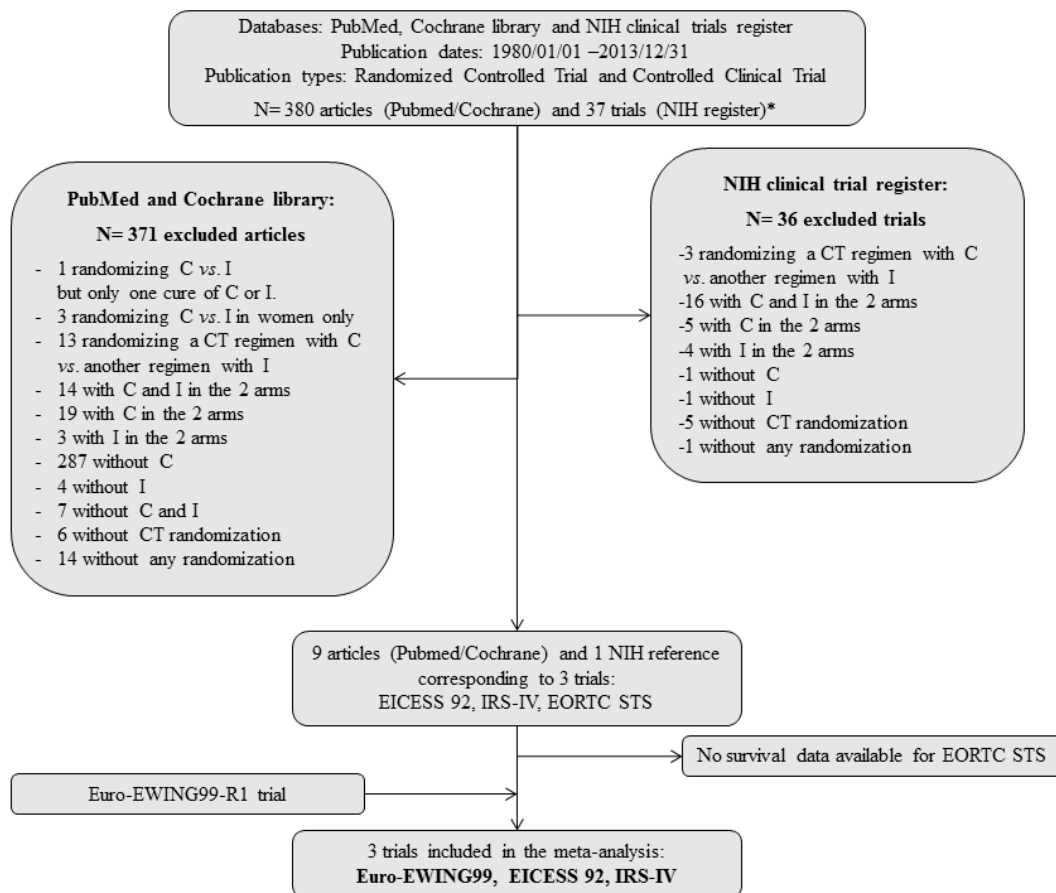


Figure 7 : Procédure de sélection des essais inclus dans la méta-analyse.

C=Cyclophosphamide, I=Ifosfamide, STS=Soft tissue sarcoma.

A noter que l'essai EE99-R1 n'était pas encore publiée au moment de la recherche bibliographique initiale et n'apparaît donc pas sur la figure comme résultat dans la procédure de recherche bibliographique.

Tableau 8 : Caractéristiques des essais cliniques randomisés inclus dans la méta-analyse comparant cyclophosphamide et ifosfamide.

Trial ^{ref}	Accrual period	Type of trial and design	N	Median follow-up [Q1-Q3]	Inclusion criteria			Eligibility criteria for randomization	Randomized regimens		Primary endpoint	Results of ITT [†] analysis
					Pathology [‡]	Primary tumor site	Age (years)		Ifo (dose/3w)	Cyclo (dose/3w)		
EE99-R1 ⁶³	2000-2010	Multicentric Phase III Non-inferiority	856	5.9 [3.8; 8.0]	EWS	Bone or soft tissue	< 50	Localized tumors With a good response to preoperative CT*	7 VAI (3 g/m ² x2)	7 VAC (1.5 g/m ² x1)	3y-EFS	78% (VAI) 75% (VAC)
EICESS92 ⁸⁷	1992-1999	Multicentric Phase III Non-inferiority	155	8.3 [6.9; 10.6]	ESFT	Bone	< 35	Localized tumors of less than 100mL	10 VAIA (2 g/m ² x3)	10 VACA (1.2 g/m ² x1)	3y-EFS	74% (VAIA) 73% (VACA)
IRS-IV ⁸⁸	1991-1997	Multicentric Phase III Superiority	517	8.0 [5.5; 9.9]	RMS, undifferentiated sarcoma	Soft tissue	< 21	Localized tumors**	8 VAI [◊] (1.8 g/m ² x5)	8 VAC (2.2 g/m ² x1)	3y-EFS	77% (VAI) 73% (VAC)

N: Nombre de patients randomisés, Cyclo: cyclophosphamide, Ifo: Ifosfamide, CT : chimiothérapie, VAI : vincristine, actinomycine, ifosfamide, VAC: vincristine, actinomycine, cyclophosphamide, VAIA: vincristine, actinomycine, ifosfamide, adriamycine, VACA: vincristine, dactinomycin, cyclophosphamide, adriamycine, EFS: survie sans évènement, Q1: premier quartile, Q3: troisième quartile.

‡: EWS: sarcoma d'Ewing, ESFT: tumeur de la famille des sarcomes d'Ewing, RMS: rhabdomyosarcome.

†: Analyse en intention de traiter, w: semaine, y: année

* patients avec soit une bonne réponse histologique à la chimiothérapie pré-opératoire (<10% de cellules résiduelles viables), soit une petite tumeur (< 200 mL) réséquée au diagnostic ou traitée par radiothérapie sans chirurgie.

** après exclusion des patients traités pour tumeur para-testiculaire avec une résection complète ou une tumeur de l'orbite ou des paupières avec une résection complète ou avec une maladie microscopique résiduelle et après exclusion des patients avec anomalie rénale pré existante.

Tableau 9 : Caractéristiques des patients randomisés dans chaque essai inclus dans la méta-analyse.

	EE99-R1		EICESS92		IRS-IV		Pooled dataset	
	VAI (n=425)	VAC (n=431)	VAIA (n=76)	VACA (n=79)	VAI (n=254)	VAC (n=263)	Ifo arm (n=755)	Cyclo arm (n=773)
Sex								
- male	251	258	46	49	141	152	438	459
- female	174	173	30	30	113	111	317	314
Age (years)								
Median	14.0	14.6	15.4	13.8	6.0	5.0	11.8	12.0
[0 ; 10]	120	99	17	18	172	190	309	307
[10 ; 15]	127	127	19	31	54	39	200	197
[15 ; 20]	88	107	23	17	28	32	139	156
[20 ; 50]	90	98	17	13		2	107	113
Pathology								
- ESFT	415	416	73	77			488	493
- RMS					234	248	234	248
- Other bone sarcoma	1	1	1				2	1
- Other STS	10	14	2	2	20	15	32	31
Tumor stage								
- Localized disease	425	430	72	78	244	253	741	761
- Metastatic disease		1	3	1			3	2
- NA			1		10	10	11	10
Number of events	106	118	28	28	62	82	196	228
- Progression/relapse	102	115	27	27	55	69	184	211
- Death as first event	4	3	1	1	7	13	12	17
Number of deaths	83	88	18	21	51	64	152	173

VAI: vincristine, actinomycine, ifosfamide, VAC: vincristine, actinomycine, cyclophosphamide, VAIA: vincristine, actinomycine, ifosfamide, Adriamycine, VACA: vincristine, actinomycine, cyclophosphamide, adriamycine, Ifo: ifosfamide, Cyclo: cyclophosphamide, CT: chimiothérapie, ESFT: tumeur de la famille des sarcomes d'Ewing, RMS: rhabdomyosarcome, STS: sarcoma des tissus mous, NA: non applicable.

Analyse de la qualité des essais randomisés inclus

a- Validité de la randomisation

Aucun biais dans la randomisation au cours du temps n'a été observé dans aucun essai. De plus, aucun déséquilibre n'a été détecté entre les caractéristiques initiales des patients randomisés dans les différents groupes de traitement dans chaque essai.

b- Population d'analyse

La méta-analyse a été réalisée sur une population en intention de traiter. Par conséquent tous les patients randomisés dans les groupes de traitement cyclophosphamide et ifosfamide ont été inclus dans la méta-analyse même si certains patients avaient été exclus des analyses initiales de l'essai. Au total, 65 patients randomisés avaient été exclus des analyses initiales publiées, tous dans l'essai IRS-IV. Ces 65 patients ont été inclus dans la méta-analyse.

c- Suivi selon le bras de randomisation

Pour chaque bras de randomisation, des courbes de Kaplan-Meier inversées ont été tracées de façon à analyser la durée du suivi dans chaque bras de randomisation de chaque essai : aucun biais n'a été observé. Le suivi médian était de 6,8 ans [Q1-Q3: 4,5-8,9] dans l'ensemble de la population de méta-analyse et il n'y avait pas de différence entre les bras de traitement de chaque essai (EE99-R1: 5,9 et 6,0 pour VAC et VAI, respectivement. EICESS92: 8,2 et 8,3 pour VAIA et VACA, respectivement. IRS-IV: 7,7 et 8,1 pour VAI et VAC, respectivement).

Analyse de survie

Avec un suivi médian de 6,8 ans (5,9 dans l'essai EE99-R1 et 8,0 dans l'ensemble de validation comportant les essais randomisés EICESS92 et IRS-IV), 424 événements de type progression/récidive/décès ont été enregistrés : 224 dans EE99-R1 et 200 dans EICESS92 et IRS-IV, dont 395 progressions ou récurrences et 29 décès (dont 6 décès liés au traitement, 9 liés à la progression de la maladie, 9 en rapport avec d'autres causes et 5 de causes inconnues). Au total 325 décès sont survenus : 171 dans EE99-R1 et 154 dans EICESS92 et IRS-IV.

L'analyse de réplique réalisée sur l'ensemble de validation EICESS92 + IRS-IV (n=672 patients) n'a pas permis d'identifier d'interaction significative entre le sexe et le type d'agent alkylant par l'approche principale en une étape (méthode OSM à effets fixes avec âge en 3 catégories) sur la survie sans progression (HR=0,97, IC95%=0,55-1,72, p=0,93, **Figure 8**), et ce sans hétérogénéité significative entre les deux essais de l'ensemble de validation (p=0,62). Les estimations des termes d'interaction étaient très similaires dans les analyses de sensibilité, n'identifiant aucune tendance en faveur d'une interaction sexe * traitement dans l'ensemble de validation, quelle que soit la méthode utilisée : OSM à effets aléatoires avec âge en 3 catégories (HR=0,98, IC95%=0,55-1,73, p=0,93), OSM à effets fixes avec âge en continu (HR=0,96, IC95%=0,55-1,71, p=0,90) ou méthode PWT en deux étapes (HR=0,97, IC95%=0,55-1,73, p=0,92) (**Tableau 10**). De même, aucune interaction entre le sexe et le type d'agent alkylant n'a été identifiée pour la survie globale dans l'ensemble de validation EICESS92 + IRS-IV que ce soit avec la méthode principale (OSM à effets fixes avec âge en 3 catégories, HR=1,00, IC95%=0,52-1,92, p=0,99, **Figure 9**) ou avec les méthodes des analyses de sensibilité (OSM à effets aléatoires avec âge en 3 catégories : HR=1,00, IC95%=0,52-1,93, p=1,00, OSM à effets fixes avec âge en continu : HR=0,99, IC95%=0,51-1,91, p=0,98, ou méthode PWT en deux étapes : HR=0,99, IC95%=0,51-1,91, p=0,98) (**Tableau 10**).

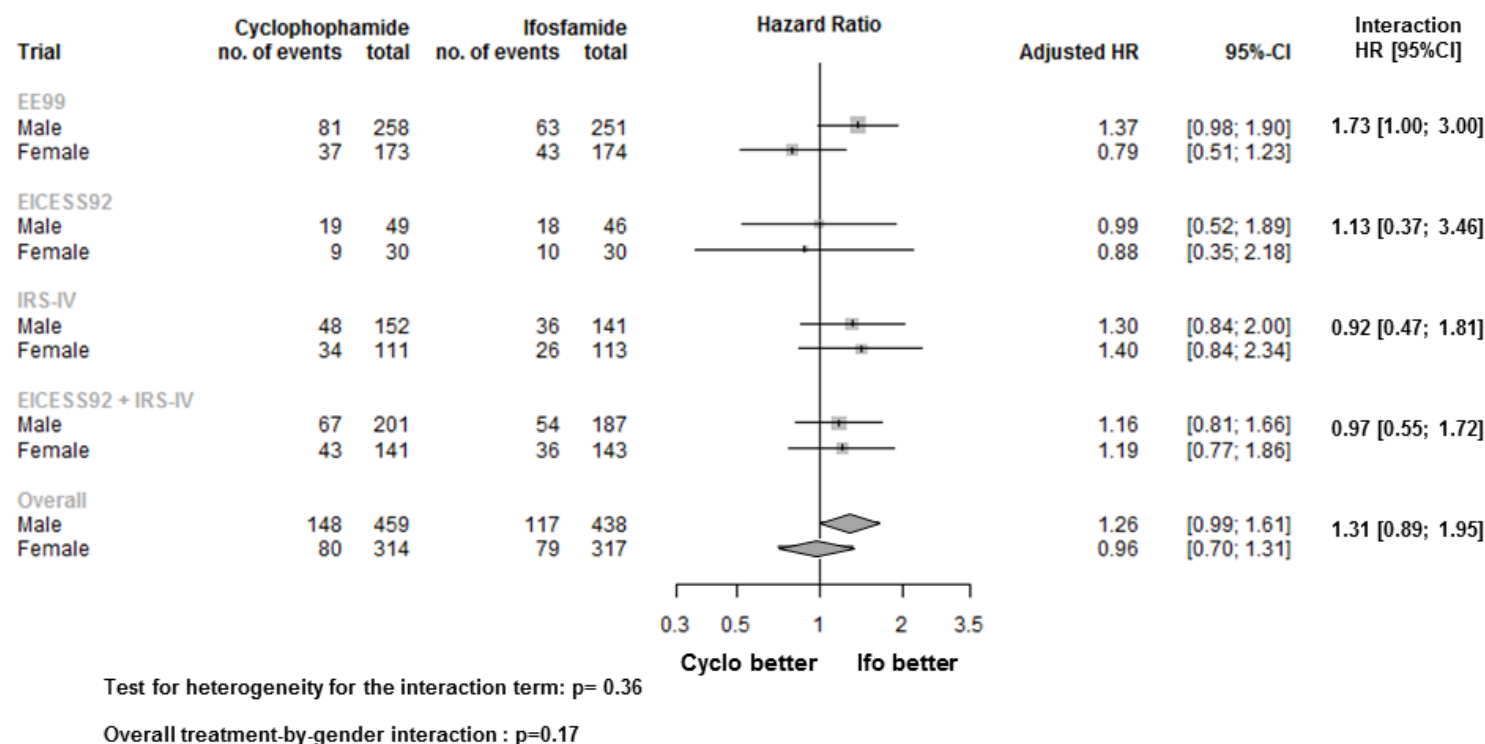
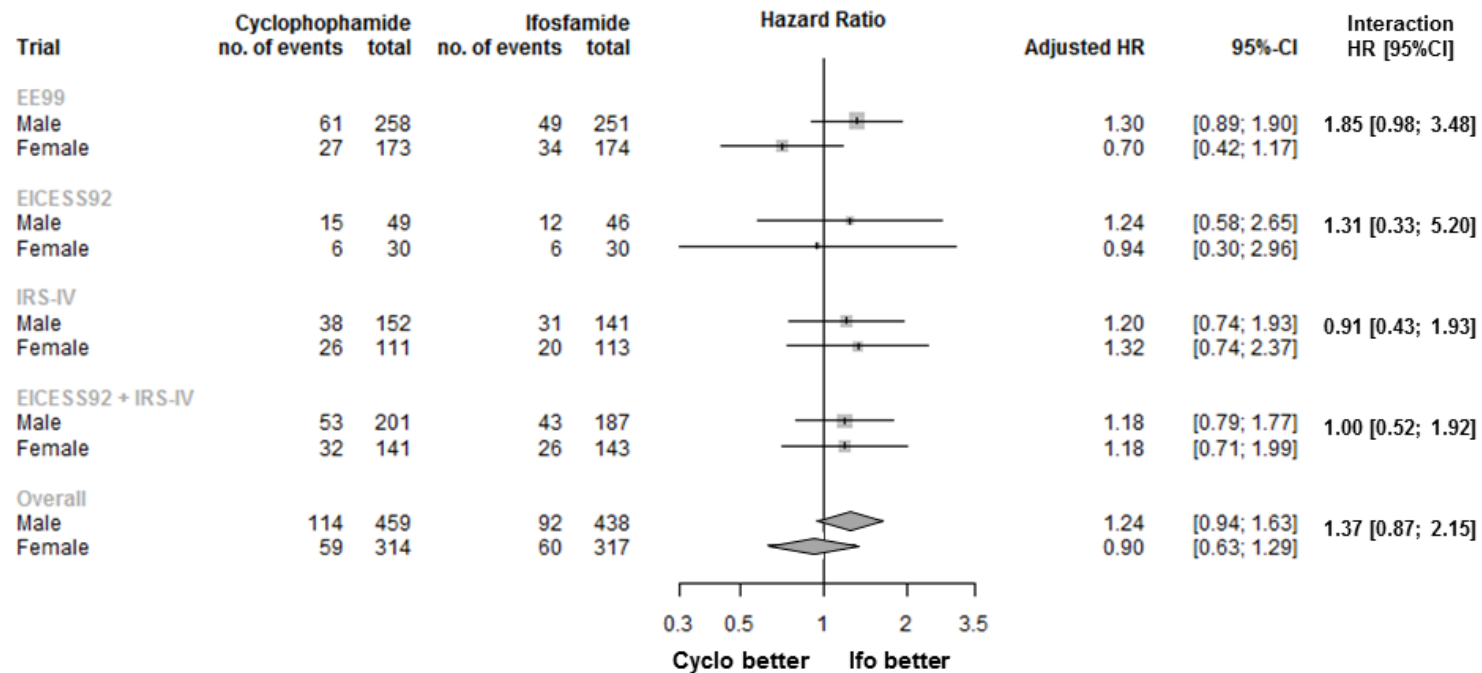


Figure 8 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survie sans progression dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).

Les HRs indiqués sur le côté droit de la figure représentent les HR des termes d'interaction sexe * traitement (HR Cyclo vs. Ifo chez les hommes / HR Cyclo vs. Ifo chez les femmes) estimées indépendamment dans chaque essai, puis dans l'ensemble de validation (EICESS92 + IRS-IV) puis dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV), par la méthode en une étape (OSM), stratifiée sur l'essai et le sexe,

et incluant comme covariables à effets fixes le traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) et l'âge (< 12, 12-18, et >18 ans). L'hétérogénéité de l'interaction entre les essais a été évaluée en utilisant un terme d'interaction d'ordre 3 entre sexe, traitement et essai.

Le centre de chaque carré représente le HR de l'effet traitement en fonction du sexe pour chaque essai et pour l'ensemble de validation (EICES92 + IRS-IV); la ligne horizontale de part et d'autre du carré représente l'intervalle de confiance à 95% du HR. La surface du carré est proportionnelle à la contribution de l'essai à la méta-analyse. Le centre des losanges noirs représente le HR de l'effet traitement en fonction du sexe pour la population globale de méta-analyse, tandis que ses extrémités représentent son intervalle de confiance à 95%.



Test for heterogeneity for the interaction term: $p = 0.35$

Overall treatment-by-gender interaction : $p = 0.17$

Figure 9 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survie globale dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).

Tableau 10 : Estimations des Hazard Ratios (HR) associés aux termes d'interaction sexe * traitement pour la survie sans progression dans le l'essai EE99-R1, l'ensemble de validation EICESS92 + IRS-IV et la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) dans les analyses principales et de sensibilité.

	Training set EE99-R1 (n=856)	Validation set EICESS92 + IRS-IV (n=672)	Pooled analysis EE99-R1 + EICESS92 + IRS-IV (n=1528)
	HR (95%CI)	HR (95%CI)	HR (95%CI)
Progression-free survival			
- Main analysis: OSM, fixed effects, age category	1.73 (1.00-3.00), p=0.051	0.97 (0.55-1.72), p=0.93	1.31 (0.89;1.95), p=0.17
- Sensitivity analyses			
* OSM, random effects, age category	1.73 (1.00-3.00), p=0.051	0.98 (0.55-1.73), p=0.93	1.32 (0.89;1.95), p=0.17
* OSM, fixed effects, age continuous	1.71 (0.98-2.96), p=0.057	0.96 (0.55-1.71), p=0.90	1.31 (0.89-1.95), p=0.17
* PWT, fixed effects, age category		0.97 (0.55-1.73), p=0.92	1.32 (0.88;1.96), p=0.18
Overall survival			
- Main analysis: OSM, fixed effects, age category	1.85 (0.98-3.48), p=0.056	1.00 (0.52-1.92), p=0.99	1.37 (0.87;2.15), p=0.17
- Sensitivity analyses			
* OSM, random effects, age category	1.85 (0.98-3.48), p=0.056	1.00 (0.52-1.93), p=1.00	1.37 (0.87;2.16), p=0.17
* OSM, fixed effects, age continuous	1.80 (0.96-3.38), p=0.068	0.99 (0.51-1.91), p=0.98	1.37 (0.87;2.16), p=0.17
* PWT, fixed effects, age category		0.99 (0.51-1.91), p=0.98	1.37 (0.87;2.16), p=0.17

HR: hazard ratio du terme d'interaction sexe * traitement (HR Cyclo vs. Ifo chez les hommes / HR Cyclo vs. Ifo chez les femmes)

95%CI: Intervalle de confiance à 95%

OSM: méthode en une étape (*one-stage model*); PWT: méthode en deux étapes (*pooling of within-trial covariate interactions*); catégories d'âge : <12 ans, 12-18 ans et >18 ans

L'étude de la population globale de la méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV, n=1528 patients) a mis en évidence un bénéfice absolu estimé en terme de PFS à cinq ans associé à l'ifosfamide par rapport au cyclophosphamide supérieur chez les hommes +6,0% (PFS à 5 ans = 73,7% contre 67,9%), par rapport aux femmes (+ 0,2%, PFS à 5 ans = 75,2% contre 75,0%) (**Figure 10**). Cependant, l'estimation de l'effet de l'interaction entre le type d'agent alkylant et le sexe commun à tous les essais inclus dans la méta-analyse sur la PFS n'était pas statistiquement significative que ce soit avec la méthode principale (OSM à effets fixes avec âge en 3 catégories, HR=1,31, IC95%=0,89-1,95, p=0,17) ou avec les méthodes des analyses de sensibilité (OSM à effets aléatoire avec âge en 3 catégories : HR=1,32, IC95%=0,89-1,95, p=0,17, OSM à effets fixes avec âge en continu : HR=1,31, IC95%=0,89-1,95, p=0,17, ou méthode PWT en deux étapes : HR=1,32, IC95%=0,88-1,96, p=0,18) (**Tableau 10**), et ce sans hétérogénéité significative entre les trois essais (p=0,36, **Figure 8**). Des résultats similaires ont été retrouvés pour la survie globale, sans interaction statistiquement significative dans la population globale de la méta-analyse entre le type d'agent alkylant et le sexe quelle que soit la méthode utilisée (**Figure 9, Tableau 10**).

Une analyse de l'hétérogénéité de l'interaction entre le type d'agent alkylant et le sexe en fonction des catégories d'âge a été réalisée pour la survie sans progression et la survie globale en utilisant l'approche principale en une étape (OSM à effet fixes, âge en 3 catégories). Aucune hétérogénéité statistiquement significative n'a été observée en fonction de la classe d'âge (PFS : p=0,88, Figure 11; OS : p=0,64, **Figure 12**).

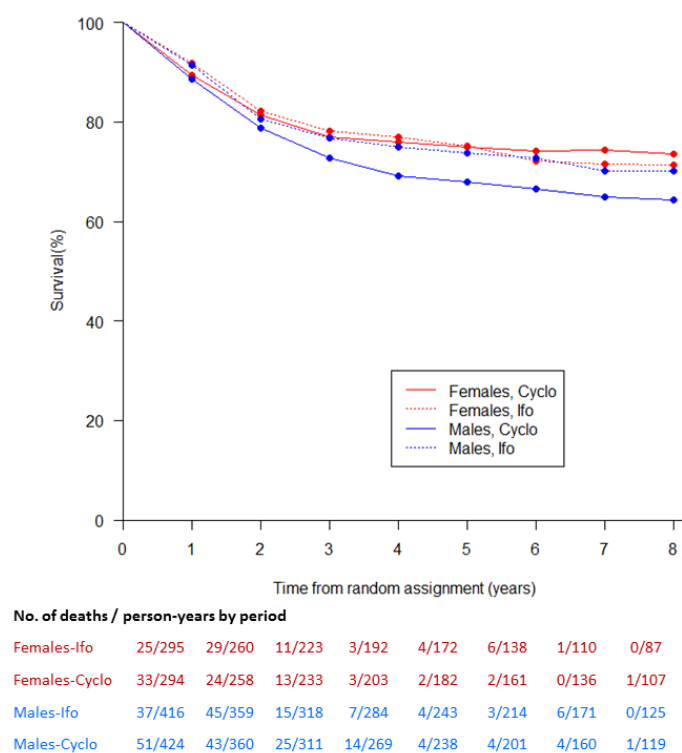
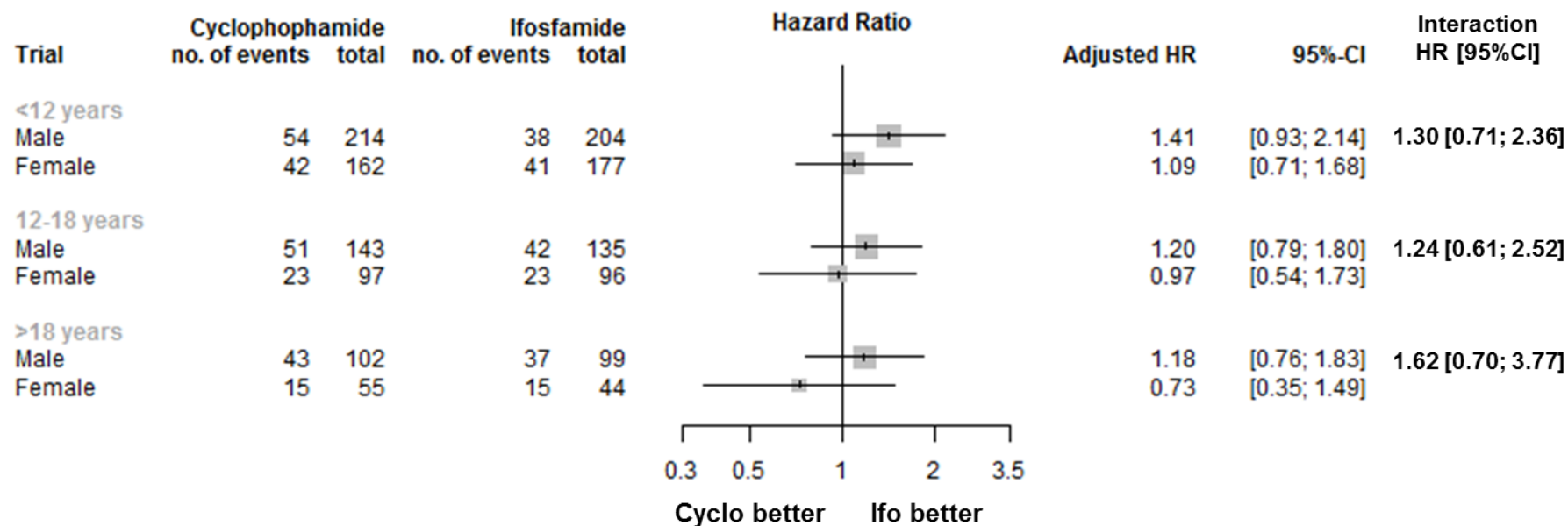
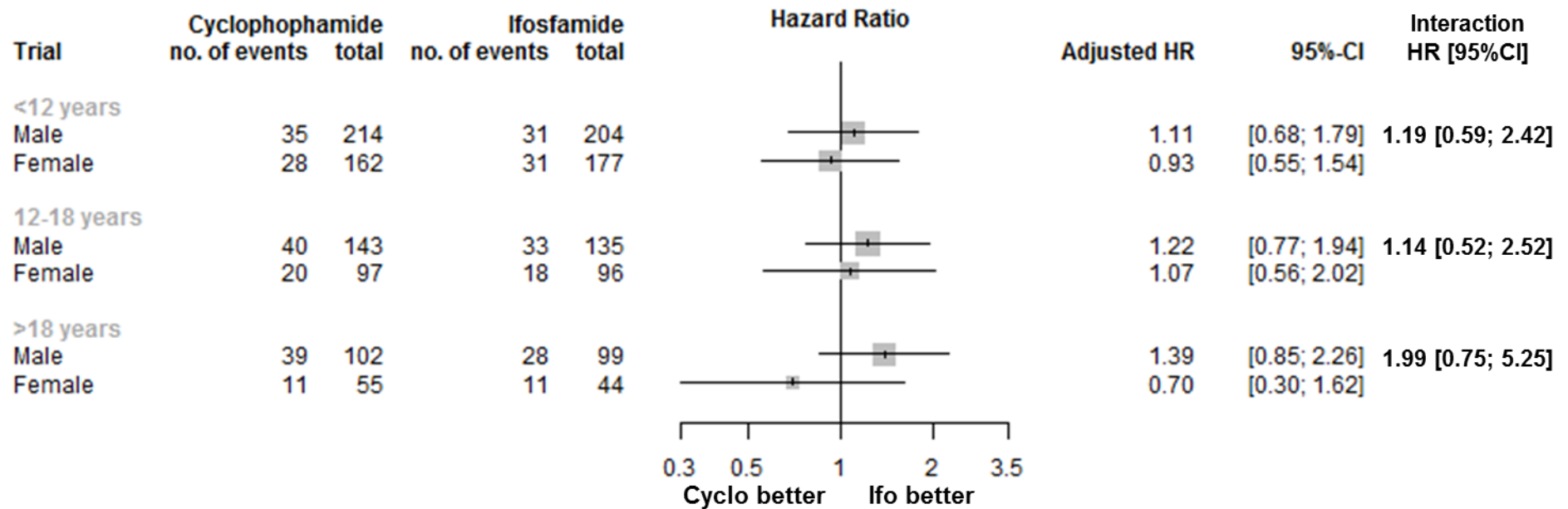


Figure 10 : Courbes de survie sans progression en fonction du type d’agent alkylant (cyclophosphamide vs. ifosfamide) et du sexe estimées à partir de la population globale de la méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV).



Test for heterogeneity for the interaction term: $p = 0.88$

Figure 11 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe et de la catégorie d'âge (<12 ans, 12-18 ans, >18 ans) sur la survie sans progression dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) (modèle à effets fixes).



Test for heterogeneity for the interaction term: $p = 0.64$

Figure 12 : Forest plot des estimations des Hazard Ratios (HR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe et de la catégorie d'âge (<12 ans, 12-18 ans, >18 ans) sur la survie globale dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV) (modèle à effets fixes).

Analyse de toxicité

Le nombre de patients ayant développé au moins une toxicité aiguë sévère pendant la période randomisée par sexe et par groupe de traitement sont rapportées pour chaque essai inclus dans la méta-analyse dans le Tableau 11. Au total, 69,8%, 52,8% et 7,8% des patients ont présenté au moins un épisode de neutropénie aiguë, de toxicité infectieuse ou de toxicité rénale sévère, respectivement. Comme l'illustrent les **Figure 13, 13 et 14**, aucune interaction significative n'a été identifiée entre le sexe et le type d'agent alkylant pour la survenue de leucopénie/neutropénie (Odds Ratio OR=0,82, IC95%=0,49-1,36, p=0,43), de toxicité infectieuse (OR=1,11, IC95%=0,71 -1,71, p=0,65) ou de toxicité rénale (OR=1,71, IC95%=0,76-3,85, p=0,19). Ces estimations étaient relativement similaires d'un essai à l'autre, sans hétérogénéité significative inter-essais (tests d'hétérogénéité pour la leucopénie/neutropénie : p=0,81, toxicité infectieuse : p=0,12 et toxicité rénale : p=0,19). Par rapport à l'ifosfamide, les patients traités par cyclophosphamide ont présenté significativement plus souvent au moins un épisode de leucopénie/neutropénie sévère (OR cyclo vs. ifo=1,47, IC95%=1,14-1,88, p=0,003) ou de toxicité infectieuse (OR cyclo vs. ifo=1,55, IC95%=1,25-1,93, p <0,0001), mais moins de toxicité rénale sans que ce résultat soit statistiquement significatif (OR cyclo vs. ifo=0,71, IC95%=0,48-1,06, p=0,098). Indépendamment du groupe de traitement, les femmes ont présenté significativement plus souvent au moins un épisode de leucopénie/neutropénie sévère (OR sexe féminin vs. masculin=1,39, IC95%=1,08-1,79, p=0,013) ou de toxicité infectieuse (OR sexe féminin vs. masculin=1,25, IC95%=1,01-1,56, p=0,041), mais pas significativement plus de toxicité rénale (OR sexe féminin vs. masculin=1,22, IC95%=0,83-1,82, p=0,32).

Tableau 11 : Nombre de patients ayant présenté au moins une toxicité sévère par sexe et par groupe de randomisation dans chaque essai inclus dans la méta-analyse

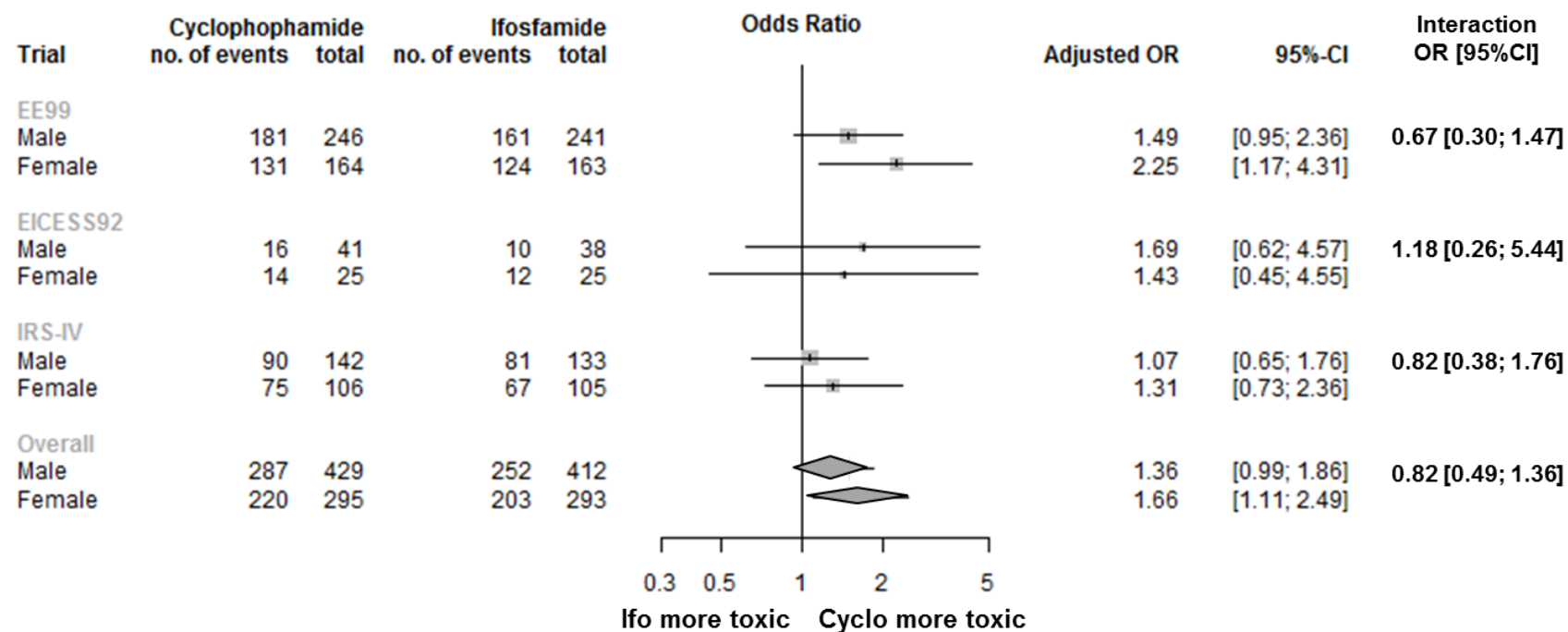
Acute toxicity	Gender	Treatment	Number of patients with acute toxicity / number of patients with available information (%)					
			EE99-R1 (n=814)		EICESS92 (n=129)		IRS-IV (n=486)	
Leucopenia/neutropenia	Female	VAC	131	/ 152 (86.2)	14	/ 25 (56.0)	75	/ 106 (70.8)
		VAI	124	/ 155 (80.0)	12	/ 25 (48.0)	67	/ 105 (63.8)
	Male	VAC	181	/ 234 (77.4)	16	/ 40 (40.0)	90	/ 142 (63.4)
		VAI	161	/ 225 (71.6)	10	/ 37 (27.0)	81	/ 133 (60.9)
Infection	Female	VAC	90	/ 161 (55.9)	13	/ 25 (52.0)	73	/ 106 (68.9)
		VAI	89	/ 161 (55.3)	9	/ 25 (36.0)	56	/ 105 (53.3)
	Male	VAC	127	/ 246 (51.6)	20	/ 40 (50.0)	87	/ 142 (61.3)
		VAI	88	/ 240 (36.7)	15	/ 37 (40.5)	75	/ 133 (56.4)
Renal toxicity*	Female	VAC	8	/ 160 (5.0)	5	/ 24 (20.8)	5	/ 106 (4.7)
		VAI	22	/ 160 (13.8)	6	/ 25 (24.0)	5	/ 105 (4.8)
	Male	VAC	13	/ 246 (5.3)	9	/ 40 (22.5)	7	/ 142 (4.9)
		VAI	12	/ 239 (5.0)	5	/ 38 (13.2)	13	/ 133 (9.8)
Thrombocytopenia	Female	VAC	79	/ 161 (49.1)	4	/ 25 (16.0)	57	/ 106 (53.8)
		VAI	72	/ 161 (44.7)	0	/ 25 (0.0)	38	/ 105 (36.2)
	Male	VAC	102	/ 245 (41.6)	4	/ 40 (10.0)	70	/ 142 (49.3)
		VAI	64	/ 241 (26.6)	1	/ 37 (2.7)	36	/ 133 (27.1)
Mucositis	Female	VAC	6	/ 160 (3.8)	3	/ 25 (12.0)	59	/ 106 (55.7)
		VAI	6	/ 160 (3.8)	0	/ 24 (0.0)	40	/ 105 (38.1)
	Male	VAC	5	/ 246 (2.0)	3	/ 39 (7.7)	50	/ 142 (35.2)
		VAI	5	/ 240 (2.1)	2	/ 37 (5.4)	55	/ 133 (41.4)
Diarrhea	Female	VAC	1	/ 160 (0.6)	1	/ 12 (8.3)	18	/ 106 (17.0)
		VAI	5	/ 160 (3.1)	0	/ 14 (0.0)	9	/ 105 (8.6)
	Male	VAC	4	/ 246 (1.6)	1	/ 23 (4.3)	18	/ 142 (12.7)
		VAI	1	/ 240 (0.4)	0	/ 26 (0.0)	12	/ 133 (9.0)
Liver toxicity	Female	VAC	7	/ 160 (4.4)	1	/ 25 (4.0)	15	/ 106 (14.2)
		VAI	11	/ 159 (6.9)	2	/ 24 (8.3)	9	/ 105 (8.6)
	Male	VAC	15	/ 245 (6.1)	3	/ 38 (7.9)	23	/ 142 (16.2)
		VAI	9	/ 239 (3.8)	0	/ 37 (0.0)	8	/ 133 (6.0)
Central	Female	VAC	1	/ 160 (0.6)	2	/ 24 (8.3)	5	/ 106 (4.7)

neurologic toxicity		VAI	4 / 160 (2.5)	0 / 24 (0.0)	7 / 105 (6.7)
	Male	VAC	2 / 244 (0.8)	0 / 39 (0.0)	7 / 142 (4.9)
		VAI	3 / 240 (1.3)	0 / 36 (0.0)	6 / 133 (4.5)
Peripheral neurologic toxicity	Female	VAC	11 / 159 (6.9)	3 / 25 (12.0)	26 / 106 (24.5)
		VAI	15 / 159 (9.4)	1 / 24 (4.2)	25 / 105 (23.8)
	Male	VAC	17 / 245 (6.9)	3 / 39 (7.7)	35 / 142 (24.6)
		VAI	8 / 240 (3.3)	2 / 37 (5.4)	34 / 133 (25.6)
Cardiac toxicity	Female	VAC	3 / 133 (2.3)	5 / 23 (21.7)	2 / 106 (1.9)
		VAI	9 / 143 (6.3)	4 / 22 (18.2)	2 / 105 (1.9)
	Male	VAC	6 / 210 (2.9)	8 / 36 (22.2)	3 / 142 (2.1)
		VAI	6 / 208 (2.9)	8 / 33 (24.2)	1 / 133 (0.8)

VAI: vincristine, actinomycine, ifosfamide, VAC: vincristine, actinomycine, cyclophosphamide

Le grade des effets secondaires a été définis selon les critères du NCI CTCAE-v2 pour les essais EE99-R1 et EICESS92, et selon le NCI CTCAE-v1 pour l'essai IRS-IV.

*Toxicité rénale sévère ($\geq$ grade 2): au moins un épisode d'augmentation de la créatinine > 1.5 le taux de base ou de diminution du débit de filtration glomérulaire $< 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ou de diminution du taux de réabsorption des phosphates $< 80\%$.

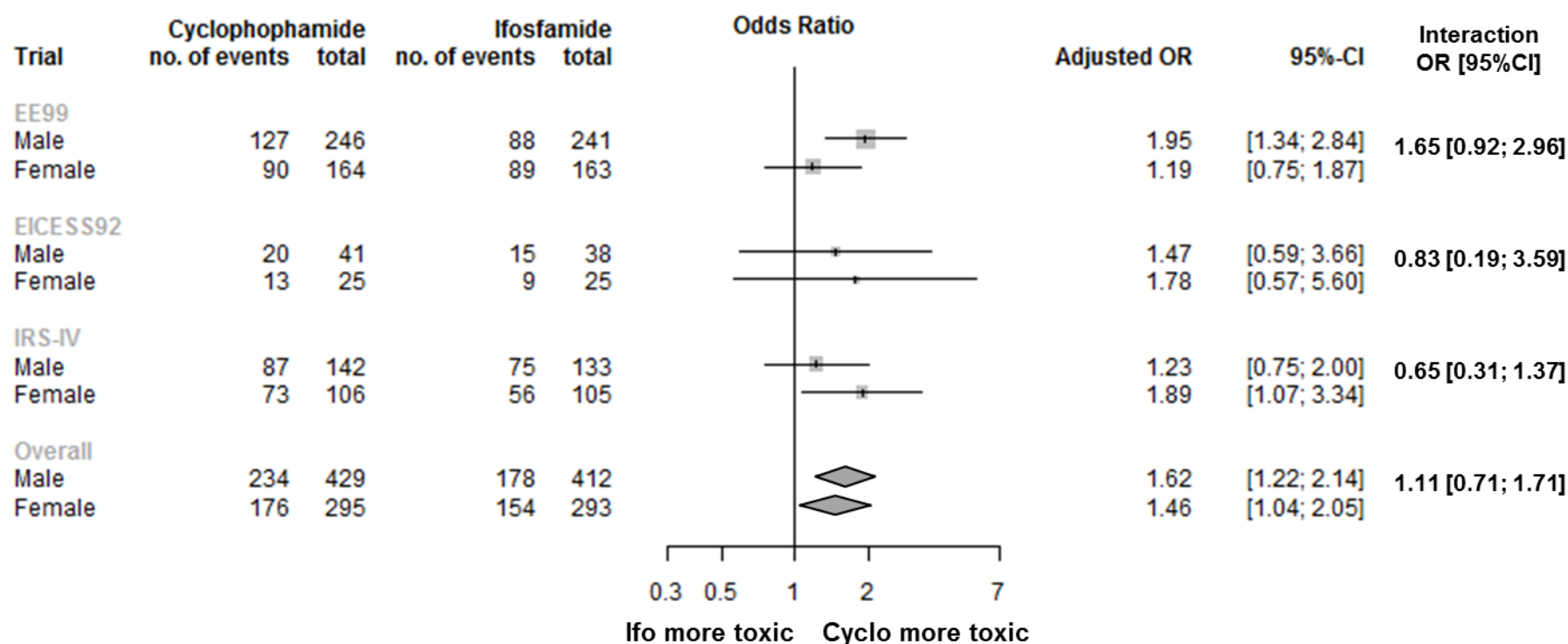


Test for heterogeneity for the interaction term: $p=0.81$

Overall treatment-by-gender interaction : $p=0.43$

Figure 13 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité hématologique de type leucopénie/neutropénie sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).

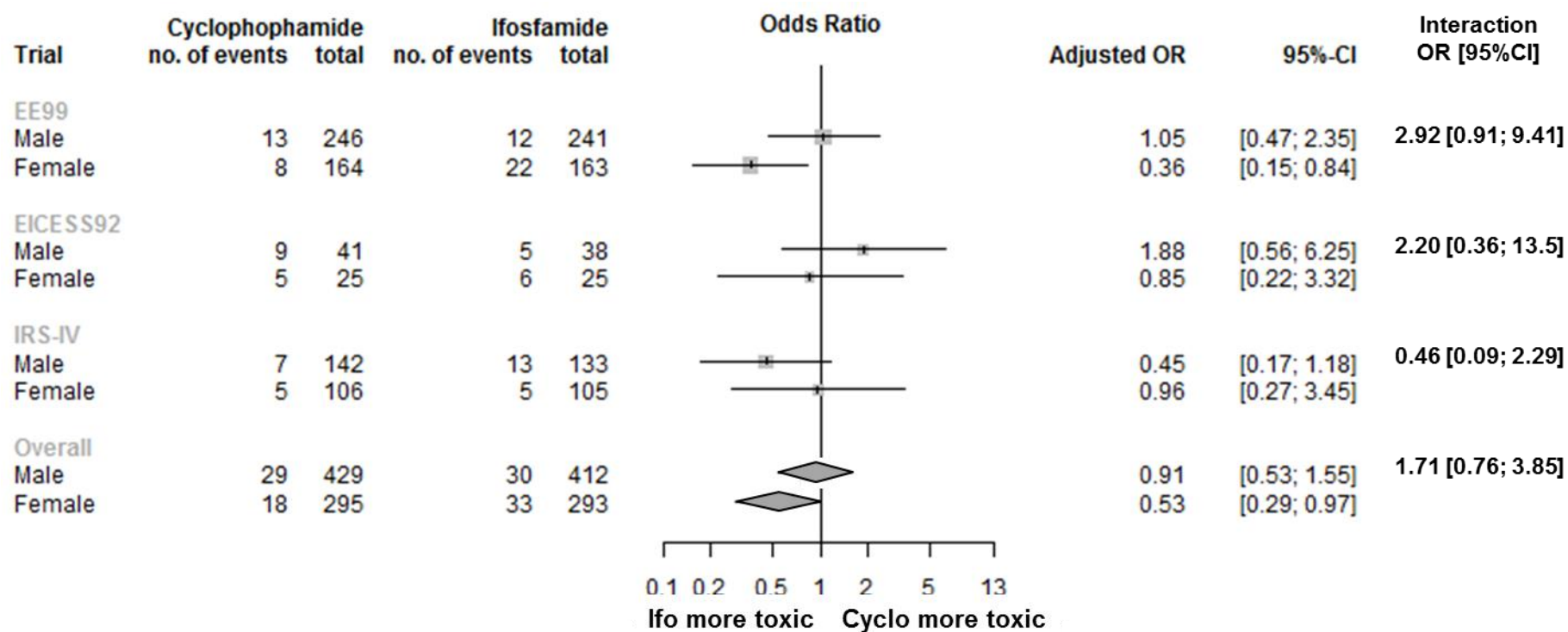
Les Odds Ratios indiqués sur le côté droit de la figure représentent les ORs des termes d'interaction sexe * traitement (OR Cyclo vs. Ifo chez les hommes / OR Cyclo vs. Ifo chez les femmes) estimées indépendamment dans chaque essai puis dans la population globale de méta-analyse (EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV), par la méthode en une étape (OSM), stratifiée sur l'essai et le sexe, et incluant comme covariables à effets fixes le traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) et l'âge (< 12, 12-18, et >18 ans). L'hétérogénéité de l'interaction entre les essais a été évaluée en utilisant un terme d'interaction d'ordre 3 entre sexe, traitement et essai.



Test for heterogeneity for the interaction term: $p = 0.12$

Overall treatment-by-gender interaction : $p = 0.65$

Figure 14 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité infectieuse sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICES92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).



Test for heterogeneity for the interaction term: $p = 0.19$

Overall treatment-by-gender interaction : $p = 0.19$

Figure 15 : Forest plot des estimations des Odds Ratios (OR) de l'effet traitement (cyclophosphamide vs. ifosfamide) en fonction du sexe sur la survenue d'au moins une toxicité rénale sévère sur la période randomisée dans les essais EE99-R1, EICESS92 et IRS-IV (modèle à effets fixes).

DISCUSSION

L'analyse des résultats de l'essai clinique randomisé EE99-R1 avaient mis en évidence une interaction marginale entre le sexe et le type de traitement, avec un risque accru d'évènements tumoraux (progression, récurrence, second cancer, décès) chez les hommes en cas de traitement par cyclophosphamide et inversement un risque accru d'évènements chez les femmes en cas de traitement par ifosfamide. Ces résultats à la limite de la significativité nécessitaient d'être répliqués pour être pris en considération dans la stratégie thérapeutique.

En utilisant un ensemble de validation indépendant de deux essais cliniques randomisés (EICESS92 et IRS-IV), nous n'avons pas répliqué les résultats de l'essai EE99-R1 concernant l'interaction entre le sexe et le type d'agent alkylant ni sur la PFS ni sur l'OS, et ce quelle que soit la méthode statistique utilisée : méthode en une ou deux étapes, avec ou sans effet aléatoire sur le traitement spécifique à l'essai (de façon à considérer une possible hétérogénéité inter-essais même si les tests d'hétérogénéité n'étaient pas significatifs), avec l'âge considéré comme covariable catégorielle ou continue. De surcroît, aucune interaction significative n'a été observée lors de la mise en commun des trois essais, sans hétérogénéité significative ni entre les essais inclus dans la méta-analyse, ni entre les différentes catégories d'âge étudiées (<12, 12-18 et > 18 ans).

Concernant la toxicité, nous n'avons identifié aucune interaction entre le sexe et le type d'agent alkylant sur la survenue d'au moins une toxicité sévère de type leucopénie/neutropénie, infection ou toxicité rénale. Par contre, le cyclophosphamide était significativement plus hémato-toxique que l'ifosfamide indépendamment du sexe (leucopénie/neutropénie et infections) et les femmes souffraient significativement plus fréquemment d'hémato-toxicité sévère que les hommes, indépendamment du type d'agent alkylant.

Cette méta-analyse sur données individuelles est la première à évaluer une interaction potentielle entre le type d'agent alkylant et le sexe. Basée sur des essais cliniques randomisés de haute qualité comparant le cyclophosphamide à l'ifosfamide, avec un nombre total de patients supérieur à 1.500 et un long suivi, elle fournit une estimation non biaisée de l'interaction entre le type d'agent alkylant et le sexe. Enfin, même si la recherche bibliographique n'était pas limitée à l'âge ni à un type de cancer spécifique, en incluant principalement des patients pédiatriques et jeunes adultes atteints de sarcome d'Ewing ou de rhabdomyosarcome en première ligne, les sources d'hétérogénéité entre les essais ont pu être réduites (différences pharmacodynamiques, comorbidité, etc.).

Certaines études comparant ces deux agents alkylants de manière randomisée n'ont pu être incluses dans la méta-analyse. L'étude de phase 2 de l'EORTC⁸⁹ qui randomisait le cyclophosphamide et l'ifosfamide en monothérapie dans les sarcomes des tissus mous avancés ou métastatiques (n=135 patients) n'a pas été incluse dans l'étude MAIAGE en raison de l'absence de données individuelles de survie ou de toxicité disponibles, après contact avec l'investigateur principal. Cette étude a rapporté des taux de réponse plus faibles dans le groupe cyclophosphamide que dans le groupe ifosfamide, en particulier chez les hommes (taux de réponse observé de 0% et 11% chez les hommes traités avec le cyclophosphamide et l'ifosfamide, respectivement, et de 17% et 23% chez les femmes). Sur la base de ces données, nous n'avons observé aucune hétérogénéité significative de l'effet du traitement entre les sexes (test d'interaction: $p=0,12$). Dans les trois autres essais randomisés exclus car n'ayant inclus que des femmes (**Tableau 12**)⁹⁰⁻⁹², un meilleur pronostic a été rapporté avec l'ifosfamide dans deux d'entre eux^{91,92} tandis que la différence n'était pas significative dans le troisième.⁹⁰

Tableau 12 : Description des trois essais randomisés ayant comparés l’ifosfamide et le cyclophosphamide mais exclus de la méta-analyse car n’ayant inclus que des femmes.

Author	Pathology	Treatment arms	Number of patients	Response rate (CR or PR)	Progression-free survival (PFS) [‡]			Overall survival (OS)
Buzdar ⁹⁰	Breast carcinoma	FAC+BCG+levamisole	117	72.6%	Median time to progression: 17 months			Median OS: 21.4 months
		FAI+BCG+levamisole	49*	65.3%	Median time to progression: 17.8 months			Median OS: 23.5 months
Nishida ⁹¹	Ovarian epithelial cancer	PAC	53	NA	3y-PFS: 84.9%	5y-PFS: 79.0%	10y-PFS: 67.8%	NA
		PAI	52	NA	3y-PFS: 88.5%	5y-PFS: 88.5%	10y-PFS: 81.1%	NA
Pawinski ⁹²	Adenocarcinoma of uterine corpus	Cyclo	29	6.9%	Median time to progression: 7 weeks			NA
		Ifo	32	12.5%	Median time to progression: 8 weeks			NA

FAC: 5-fluorouracile, adriamycine, cyclophosphamide, FAI: 5-fluorouracile, adriamycine, cyclophosphamide, PAC: cisplatine, epirubicine, cyclophosphamide, PAI: cisplatine, epirubicine, ifosfamide, Cyclo: cyclophosphamide, Ifo: ifosfamide, CR: réponse complète, PR: réponse partielle, NA: non disponible

* Le bras FAI arm a été fermé prématurément pour cause de toxicité vésicale excessive comparativement au bras FAC.

‡: absence d’information disponible sur la précision de l’estimation (écart-type, intervalle de confiance ou nombre de sujets à risque).

Notre étude souffre néanmoins de plusieurs limitations. Tout d'abord, aucun des essais analysés n'était initialement conçu pour étudier une interaction sexe * traitement. Par conséquent la puissance nécessaire pour mettre en évidence une interaction significative à un seuil standard ($p < 0,05$) pourrait être insuffisante eu égard au relativement faible nombre d'événements observés dans chaque essai. De même les tests d'homogénéité inter-essais souffrent d'un manque de puissance, d'autant plus que le nombre d'essais inclus dans la méta-analyse est faible. En conséquence, bien que nous n'ayons pas répliqué les résultats d'EE99-R1 concernant l'interaction entre le sexe et le type d'agent alkylant sur la survie, nos résultats ne peuvent exclure de manière définitive l'existence d'une telle interaction, faute de puissance suffisante. Ensuite, outre l'essai de référence EE99-R1, nous n'avons identifié que deux autres essais randomisés pouvant être inclus dans la méta-analyse, représentaient moins de 50% du nombre total de patients inclus. Les résultats en analyse globale (EE99-R1, EICESS92 et IRS IV regroupés) restent donc très influencés par ceux de l'essai EE99-R1. Enfin, les différences de caractéristiques des populations incluses dans chaque essai et de combinaisons de chimiothérapie pourraient avoir un effet sur la variabilité des effets observés entre les essais. En effet, les patients inclus dans l'essai IRS-IV étaient plus jeunes que ceux des deux autres essais et avaient reçu quatre cures de cyclophosphamide non randomisées après les huit premiers cycles de traitement randomisés et ce, quel que soit le bras de traitement. Au contraire, dans les deux autres essais (EE99-R1 et EICESS92), tous les patients ont reçu de l'ifosfamide en chimiothérapie d'induction avant la randomisation.

Nos résultats concernant la toxicité aiguë différentielle de ces deux agents alkylants sont concordants avec ceux des études antérieurement publiées^{70,72-75}. Des différences de métabolisme pourraient expliquer ces résultats. Le cyclophosphamide et l'ifosfamide étant des agents alkylants précurseurs, une activation métabolique de ceux-ci est nécessaire. Cette activation se fait par 4-hydroxylation avec production d'acroléine urotoxique via la CYP2B6

pour le cyclophosphamide, et le CYP3A4 et le CYP3A5 pour l'ifosfamide. Le métabolisme de ces drogues aboutit également à la production de chloroacétaldéhyde néphro- et neuro-toxique via le CYP3A4 pour le cyclophosphamide et, dans une bien plus grande mesure, le CYP3A4 et le CYP2B6 pour l'ifosfamide. Concernant les toxicités différentielles selon le sexe, un risque accru de neurotoxicité sévère a été rapporté précédemment chez les femmes, mais sans que ceci puisse être analysé dans notre étude faute d'un nombre suffisant d'évènements observés.^{93,94} Enfin, alors que nous avons mis en évidence un risque d'hématotoxicité supérieure chez les femmes indépendamment de l'agent alkylant utilisé, aucune différence de toxicité hématologique liée au cytochrome P450 n'a été rapportée auparavant.

En conclusion, cette méta-analyse d'essais randomisés sur données individuelles n'a pas mis en évidence d'efficacité ni de toxicité aiguë différentielle des agents alkylants cyclophosphamide et ifosfamide selon le sexe, ce qui se traduit sur le plan statistique par l'absence d'interaction significative entre le sexe et le type d'agent alkylant. Par conséquent, le choix de l'agent alkylant ne peut être fait chez les enfants et les jeunes adultes traités pour un sarcome en fonction du sexe sur des arguments d'efficacité ou de toxicité aiguë. Il n'est par contre pas exclu que la toxicité tardive de ces traitements soit différente selon le sexe, en particulier concernant la toxicité gonadique. De façon à explorer cette hypothèse, nous avons initié un travail visant à explorer les toxicités tardives dans l'essai clinique randomisé EE99-R1, en fonction du bras de randomisation et du sexe.

II- Evaluation de l'impact pronostique de polymorphismes génétiques de gènes impliqués dans le métabolisme du méthotrexate sur l'efficacité et la toxicité du méthotrexate haute dose dans le traitement de l'ostéosarcome

INTRODUCTION

L'ostéosarcome est une tumeur solide maligne rare se développant principalement chez les adolescents et jeunes adultes. Contrairement au sarcome d'Ewing, l'ostéosarcome atteint préférentiellement les os longs (fémur, tibia, péroné, humérus) et est centré le plus souvent sur la métaphyse, à proximité du cartilage de croissance. Il s'agit d'une pathologie agressive dont le pronostic dépend avant tout du caractère métastatique et de l'opérabilité de la tumeur primitive. Le développement depuis les années 80 de stratégies thérapeutiques à base de chimiothérapie intensive et prolongée comportant du méthotrexate à haute dose (MTX) a permis l'obtention de taux de survie sans récurrence entre 50 et 70% 5 à 10 ans après le diagnostic. En outre la généralisation de la chimiothérapie pré-opératoire sous l'impulsion des protocoles T7 et T10 mis au point par Rosen au *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) a fait apparaître la réponse histologique à la chimiothérapie pré-opératoire comme un facteur pronostique essentiel^{95,96}, confirmé depuis par de multiples études⁹⁷⁻¹⁰¹. Cependant si la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire est un facteur pronostique majeur bien identifié, les facteurs responsables de la résistance à la chimiothérapie préopératoire et donc en particulier au MTX sont encore largement méconnus.

Plusieurs études ont montré que la toxicité et l'efficacité du MTX étaient liées à sa pharmacocinétique, influencée notamment par la fonction rénale et le poids du patient.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Mais ces facteurs cliniques ne permettent d'expliquer qu'une faible proportion de la variabilité interindividuelle observée de la pharmacocinétique du MTX. De plus en plus d'études

suggèrent que les polymorphismes (SNP) de gènes codant pour des transporteurs (tels que SCL19A1, SLCO1B1, ABCC2 ou ABCC4) ou des enzymes (telles que UGT1A1) impliqués dans la pharmacocinétique du MTX peuvent en partie être responsables de cette variabilité.^{105–}

¹¹¹ Les études pharmacogénétiques ont également mis en évidence des corrélations entre ces polymorphismes génétiques de gènes impliqués dans la pharmacocinétique du MTX et des critères cliniques d'efficacité ou de toxicité.^{108,110,112} Cependant la majorité de ces études ont été réalisées chez des patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques pour lesquelles le MTX est administré à des doses unitaires et cumulées moindres et selon un rythme différent. Les études pharmacogénétiques réalisées chez les patients atteints d'ostéosarcome sont rares et n'ont pu aboutir à des résultats reproductibles susceptibles de modifier la prise en charge thérapeutique des patients.^{113–115}

De façon à mieux comprendre comment les facteurs génétiques individuels et en particulier les polymorphismes génétiques localisés dans des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du MTX peuvent influencer sur les paramètres pharmacocinétiques, l'efficacité et la toxicité de la chimiothérapie à base de MTX, une étude biologique ancillaire de l'essai clinique randomisé français OS2006 a été réalisée. Nous présentons ici les résultats de l'analyse pharmacogénétique testant l'association entre SNP localisés dans des gènes impliqués dans la pharmacocinétique du MTX et des critères d'efficacité et de toxicité de la chimiothérapie à base de MTX. Les résultats concernant l'analyse d'association entre SNP et pharmacocinétique du MTX ont été rapportés séparément (Annexe 4).¹¹⁶

PATIENTS ET MÉTHODES

Population d'étude et schéma thérapeutique

L'essai clinique français OS2006 a étudié de manière randomisée l'effet de l'adjonction de 10 injections mensuelles de zolédronate, un bisphosphonate, à une chimiothérapie de première ligne sur la survie sans progression (PFS) chez des patients atteints d'ostéosarcome de haut grade (NCT: 00470223, Figure 1). La chimiothérapie était soit à base de méthotrexate (MTX) soit une association doxorubicine / cisplatine / ifosfamide (API-AI). Le choix de la chimiothérapie était fonction de l'âge : <18 ans: MTX, 18-25 ans: MTX ou API-AI selon les habitudes du centre, >25 ans: API-AI. Pour cette étude axée sur la pharmacogénétique du MTX, nous avons inclus les patients âgés de moins de 25 ans ayant débuté leur traitement par une chimiothérapie à base de MTX, quel que soit le bras de randomisation (avec ou sans zolédronate). Le schéma thérapeutique à base de MTX combinait en préopératoire : 7 cures de MTX et 2 cours d'étoposide-ifosfamide (IE), et en postopératoire : 12 MTX et 3 EI en cas de maladie localisée avec bonne réponse histologique (<10% de cellules résiduelles viables), ou 5 MTX et 5 cures de doxorubicine / cisplatine (AP) en cas de maladie localisée avec mauvaise réponse histologique, ou de maladie localisée non résécable, ou de maladie métastatique (Figure 16).

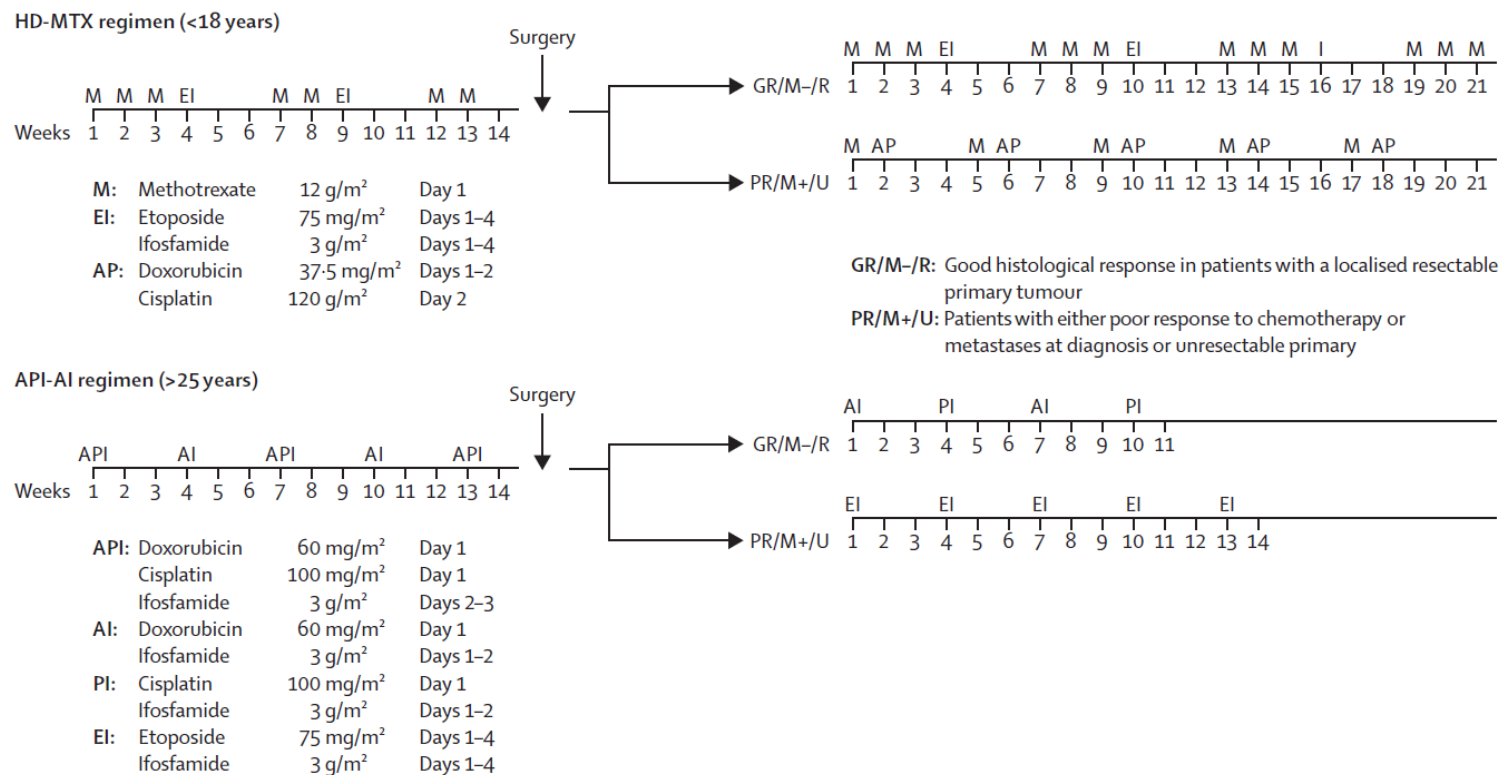


Figure 16 : Stratégie thérapeutique incluant les schémas de chimiothérapie utilisés en fonction de l'âge dans l'essai clinique OS2006.

Génotypage et contrôle qualité

L'ADN a été extrait à partir de taches de sang séché déposées sur buvard selon un procédé décrit précédemment (23). La qualité et la quantité d'ADN ont ensuite été évaluées pour chaque patient à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, ThermoScientific).

Les principaux gènes codant pour les protéines de transport ou les enzymes du métabolisme du MTX ont été identifiés à partir des données de la littérature (dont MTHFR, ABCB1, ABCC2, ABCG2, SLCO1B1, UGT1A). Nous avons sélectionné dans ces gènes les SNP capturant les variations génétiques communes (*tagged SNP*) sur la base des variations référencées dans la population européenne dans la base de données dbSNP, à l'aide de l'outil de sélection LD TAG SNP du site Web HapMap, avec les paramètres suivants: i) une fréquence d'allèle mineur (MAF) > 20% et ii) un seuil de déséquilibre de liaison $r^2 < 0,8$. Douze SNP supplémentaires dans 7 gènes (SLC19A1, ABCB1, ABCC3, ABCC4, ABCC214, ABCC1, ABCG211) décrits comme potentiellement intéressants pour la pharmacogénétique du MTX dans la littérature ont été inclus. Au total, 96 SNPs dans 28 gènes ont été inclus dans cette analyse et génotypés en utilisant la technologie VeraCode™ d'Illumina (société ADNid, Clapier, France).

Nous avons effectué un contrôle de qualité excluant (i) les patients génotypés pour <90% des SNP, (ii) les SNP génotypés pour <90% des patients (*call rate*), (iii) les SNP avec une fréquence d'allèle mineur <5%, et (iv) les SNP présentant un écart significatif par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$). Considérant un locus biallélique où l'allèle A est l'allèle majeur de fréquence allélique p et B l'allèle mineur de fréquence allélique q ($q=1-p$), les trois génotypes possibles AA, AB et BB sont dits à l'équilibre de Hardy-Weinberg si leurs fréquences génotypiques ne diffèrent statistiquement pas de p^2 , $2pq$ et q^2 , respectivement.¹¹⁷

Critères d'efficacité

Les critères de jugements utilisés pour les analyses d'efficacité étaient la réponse histologique et la survie sans progression (PFS).

La réponse histologique a été évaluée par le pourcentage de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire pour les patients opérés de leur tumeur primitive après une chimiothérapie première. Une bonne réponse histologique a été définie comme la présence de <10% de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire. Ont été inclus dans cette analyse les patients ayant reçu une chimiothérapie première à base de MTX. Les patients pour lesquels la chimiothérapie a été modifiée en pré-opératoire de MTX à API-AI ont été exclus dans la mesure où la modification de chimiothérapie pouvait être en rapport avec une réponse jugée cliniquement et radiologiquement comme insuffisante, conduisant à un biais dans l'analyse de la qualité de la réponse histologique à la chimiothérapie à base de MTX.

La PFS a été définie par le temps écoulé entre la date de randomisation et la date de premier évènement (parmi progression, rechute ou décès quelle qu'en soit la cause) ou en l'absence d'évènement la date de dernières nouvelles. Ont été inclus dans cette analyse tous les patients ayant reçu une chimiothérapie première à base de MTX.

Critères de toxicité

Ont été analysées les toxicités aiguës suivantes du MTX : leucopénie/neutropénie, thrombopénie, infection, mucite/diarrhée, toxicités rénales, hépatiques, cutanées et neurologiques centrales. Ces toxicités ont été évaluées après chaque cure de MTX pré et post-opératoire et gradées selon la classification CTCAE (version 3.0). L'analyse de toxicité a été réalisée chez tous les patients ayant reçu une chimiothérapie première à base de MTX.

Analyses statistiques

Les caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude pharmacogénétique ont été décrites et comparées à celles des patients inclus dans l'étude OS2006, traités par chimiothérapie première à base de MTX mais non génotypés. Cette comparaison a été effectuée pour détecter un biais de sélection possible. Le suivi médian a été estimé en utilisant la méthode de Schemper⁸⁰. Les courbes de PFS ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier³⁴ et les intervalles de confiance calculés par la méthode de Rothman³⁵. Les études d'association entre les SNP et les critères d'efficacité et de toxicité ont été réalisées en utilisant les modèles génétiques additifs, dominants et récessifs. Si nous considérons 2 allèles, A et B, avec B l'allèle mineur, dans le modèle génétique additif, les génotypes étaient codés 0: AA, 1: AB et 2: BB; dans le modèle dominant, 0: AA, 1: AB/BB; dans le modèle récessif, 0: AA/AB, 1: BB.

a- Analyse d'efficacité

1- Réponse histologique

La réponse histologique a été considérée comme une variable binaire (<10% de cellules résiduelles viables vs. $\geq 10\%$) et analysée à l'aide d'un modèle de régression logistique. L'analyse d'association entre SNP et réponse histologique a été réalisée selon un processus comportant plusieurs étapes.

Dans une première étape (présélection des SNP), un SNP avec son modèle génétique a été sélectionné s'il était associé de manière significative à la réponse histologique au seuil 0,05 (i) dans l'échantillon de données d'origine et (ii) dans $\geq 60\%$ de 1000 échantillons obtenus par *bootstrap* (échantillons constitués de manière aléatoire par tirage avec remise à partir de l'échantillon de données d'origine). Bien que le seuil de 60% puisse paraître arbitraire, il a été choisi en référence aux différents travaux de Sauerbrei sur l'étude de la sélection de variables, afin de sélectionner de forts facteurs explicatifs.^{118,119} Nous avons utilisé la méthode du *bootstrap* comme méthode de validation interne pour limiter le risque de faux positifs.

L'estimation de la mesure de l'association entre chaque SNP et la réponse histologique a été ajustée sur le sexe, l'âge au diagnostic et le traitement par zolédronate (dans l'hypothèse d'une absence d'interaction entre les SNP et le traitement par zolédronate). En cas d'association significative entre un SNP et la réponse histologique selon plusieurs modèles génétiques, le modèle additif a été conservé pour des raisons de puissance.

Dans une deuxième étape, tous les SNP présélectionnés ont été inclus dans un modèle de régression logistique multivarié, ajusté sur l'âge, le sexe et le traitement par zolédronate. Bien qu'un premier filtre ait été utilisé dans la sélection initiale des SNPs à partir des données HapMap (cf. *Génotypage et contrôle qualité*), un contrôle sur la dépendance des SNPs retenus au terme de l'analyse univariée a été effectué en vérifiant leur déséquilibre de liaison (estimé par le coefficient de corrélation r^2) dans les données issues du projet 1000 Génomes (population européenne) via l'application LDlink du *National Cancer Institute* (NCI).^{120,121} En l'absence de déséquilibre de liaison important ($r^2 < 0.8$), nous avons réalisé une analyse multivariée en considérant dans le même modèle les SNP identifiés comme covariables indépendantes. Une procédure de sélection descendante (*backward*) au seuil 0,05 a été appliquée aux SNP afin de construire le modèle pharmacogénétique final. Il s'agit d'une procédure de sélection de variables au cours de laquelle toutes les variables sont introduites dans le modèle, puis éliminées une à une. Dans notre analyse, la variable SNP la moins associée à la réponse histologique est la variable dont la suppression est étudiée en premier. Si sa *p-value* d'association est supérieure au seuil fixé de 0,05, alors elle est supprimée du modèle. Une fois la première variable SNP éliminée, l'élimination de la variable SNP suivante restant dans le modèle et la moins associée à la réponse histologique est étudiée. La procédure prend fin quand toutes les *p-values* d'association des variables SNP restant dans le modèle sont inférieures au seuil fixé de 0,05. Ce modèle constitue le modèle pharmacogénétique final.

La performance globale et la capacité discriminante du modèle pharmacogénétique ont ensuite été évaluées à l'aide du test de Hosmer-Lemeshow et de l'aire sous la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (AUC).

Le test de Hosmer-Lemeshow est un test d'adéquation de l'ajustement du modèle aux données qui compare les effectifs attendus des événements et non événements aux effectifs observés. La statistique de Hosmer et Lemeshow¹²² est basée sur le regroupement des individus i classés par ordre croissant de probabilité estimée de l'évènement $\hat{\pi}_i$ (dans notre analyse, par ordre croissant de probabilité estimée de mauvaise réponse histologique) en g classes de tailles n_k presque identiques (dans notre analyse, $g = 10$) :

$$\hat{C} = \sum_{k=1}^g \frac{(o_k - e_k)^2}{e_k(1 - e_k/n_k)}$$

Où o_k est le nombre d'évènements observés dans la classe k (dans notre analyse, le nombre observé de patients avec une mauvaise réponse histologique) et e_k la fréquence attendue d'évènements dans la classe k (dans notre analyse, la fréquence attendue de patients avec une mauvaise réponse histologique), c'est-à-dire la somme des probabilités estimées $\hat{\pi}_i$ dans la classe k .

$$e_k = \sum_{i=1}^{n_k} \hat{\pi}_i = n_k \bar{\pi}_k$$

La statistique de Hosmer et Lemeshow suit une distribution du chi-deux à $g-2$ degrés de liberté.

La courbe ROC trace pour différents seuils de classification le taux de vrais positifs ou sensibilité (rapport entre le nombre de vrais positifs et le nombre de vrais positifs + faux négatifs) en fonction du taux de faux positifs ou 1-spécificité (rapport entre le nombre de faux positifs et le nombre de faux positifs + vrais négatifs). L'aire sous la courbe ROC (AUC) fournit

une mesure agrégée des performances pour tous les seuils de classification possibles. Les valeurs d'AUC varient de 0 (mauvaise discrimination) à 1 (bonne discrimination). Dans le cas d'une réponse binaire, l'AUC est égale au C-index. Le C-index^{123,124} mesure la capacité discriminante du modèle c'est-à-dire la capacité du modèle à discriminer les individus avec et sans évènement (dans notre analyse, il s'agit de la capacité du modèle pharmacogénétique à discriminer les individus avec bonne et mauvaise réponse histologique). Le C-index se calcule en identifiant dans l'échantillon d'analyse les paires d'individus avec et sans évènement, concordantes n_c et discordantes n_d . Une paire est dite concordante si l'individu sans évènement observé a une probabilité estimée par le modèle plus faible que l'individu avec évènement. Une paire est dite discordante si l'individu sans évènement observé a une probabilité estimée par le modèle plus forte que l'individu avec évènement.

$$c = \frac{n_c + 0.5 (t - n_c - n_d)}{t}$$

Où t est le nombre total de paires et n l'effectif total.

$$t = \frac{n (n - 1)}{2}$$

L'AUC du modèle pharmacogénétique a ainsi été estimée. Afin de corriger un éventuel surajustement, nous avons recalculé l'AUC de ce modèle pour 1000 échantillons de même effectif obtenus par *bootstrap* (tirage au sort avec remise) à partir de l'échantillon original. Nous avons ensuite calculé la moyenne des écarts des AUC de chaque échantillon obtenu par *bootstrap* avec l'AUC de l'échantillon original. Enfin nous avons corrigé l'AUC original en lui soustrayant cette moyenne des écarts des AUC¹²⁴.

Enfin, la valeur discriminante du modèle pharmacogénétique (quantifiée par l'AUC) a été comparée à celle du modèle clinique (modèle ne comportant pas les covariables génétiques SNP) par la méthode de DeLong¹²⁵. Il s'agit de tester l'hypothèse d'égalité des AUC des deux

modèles en considérant que le rapport entre la différence des AUC des modèles et l'écart-type de cette différence suit une loi normale de moyenne 0 et de variance 1.

2- Survie sans progression (PFS)

L'analyse d'association entre les SNP et la PFS a été réalisée selon un processus similaire, mais en utilisant un modèle de Cox et non un modèle logistique, et en incluant le groupe de risque comme covariable d'ajustement supplémentaire. Cette dernière a été définie en fonction du statut métastatique et de l'opérabilité de la tumeur primitive au diagnostic (risque faible: maladie localisée et opérable de manière complète, risque élevé: maladie métastatique ou non complètement opérable). La statistique de Kent et O'Quigley basée sur la variance expliquée a été utilisée pour mesurer la performance globale du modèle (une valeur proche de 1 indique une bonne dépendance entre les prédicteurs et le critère de jugement).¹²⁶ La capacité de discrimination du modèle a été évaluée à l'aide de la statistique c de Uno (une valeur proche de 1 indique une bonne discrimination).⁴²

Pour l'analyse de ces 2 critères d'efficacité, la forme fonctionnelle de l'âge a été évaluée en la considérant soit comme une covariable catégorielle en 3 classes (<12 ans, 12-18 ans et 18-25 ans) soit comme une covariable continue. Le critère d'information Akaike (AIC), méthode de pénalisation de la vraisemblance par le nombre de paramètres, a été utilisée pour choisir le modèle le plus parcimonieux (modèle ayant l'AIC le plus faible)¹²⁷.

b- Analyse de toxicité

Le grade maximal de chaque type de toxicité aiguë a été calculée pour chaque patient pour l'ensemble du traitement par MTX, et a été binarisé comme suit pour définir les toxicités sévères: augmentation de ASAT/ALAT et toxicité hématologique ($<$, $\geq$ grade 4), mucite ($<$, $\geq$ grade 3), augmentation de la bilirubine, insuffisance rénale, toxicité cutanée, toxicité neurologique centrale et neutropénie fébrile ($<$, $\geq$ grade 2). Pour chaque type de toxicité aiguë, nous avons détaillé (i) le nombre de cures de MTX compliquées de toxicités sévères (au total et par patient), (ii) le nombre de patients présentant au moins une toxicité sévère, (iii) l'évolution dans le temps (par cure) de la proportion de patients présentant une toxicité sévère, et (iv) l'évolution dans le temps (par cure) du grade moyen de toxicité. Pour tester l'association de chaque SNP avec chaque type de toxicité aiguë, nous avons restreint l'analyse aux cures de MTX administrées à dose pleine (12 g/m^2). En effet les doses de MTX sont réduites en cas de toxicité aiguë pour éviter la répétition de la toxicité à la cure suivante.

L'analyse principale a porté pour chaque type de toxicité étudiée, sur la survenue d'au moins un épisode de toxicité aiguë sévère et été réalisée à l'aide d'un modèle de régression logistique. Les SNP ont été testés de manière indépendante. Le modèle a été ajusté sur l'âge au diagnostic (covariable continue), le sexe, le nombre de patients inclus dans le centre (covariable binaire $<$, ≥ 10 patients inclus), le bras de randomisation (zoledronate oui/non) et le nombre de cures de MTX administrées à dose pleine. L'ajustement sur le nombre de patients inclus dans le centre a été réalisé pour tenir compte d'une potentielle courbe d'apprentissage de l'administration du MTX susceptible d'entraîner une fréquence plus importante des toxicités dans les centres ayant inclus moins de patients. Du fait des multiples toxicités testées, le seuil de significativité des tests a été abaissé et fixé à 0,01. Cette analyse restant préliminaire dans un but exploratoire, nous n'avons pas utilisé d'approches plus conservatrices type Bonferroni ou *False Discovery Rate* (FDR).

Une analyse complémentaire exploratoire a été réalisée pour prendre en considération le nombre d'épisodes de toxicité aiguë sévère. Nous avons pour ce faire utilisé un modèle de régression de Poisson comptabilisant, pour chaque type de toxicité étudiée, le nombre d'épisodes de toxicité sévère.

Tous les tests statistiques étaient bilatéraux. Les analyses statistiques ont été effectuées avec R 3.0.2 et SAS 9.4. L'approbation du comité d'éthique a été obtenue pour tous les centres participants. Le consentement des parents ou des tuteurs ou du patient lui-même si majeur a été obtenu conformément aux exigences nationales en matière d'éthique de la recherche.

RÉSULTATS

Entre 01/2007 et 12/2014, 315 patients atteints d'ostéosarcome ont été randomisés dans l'essai clinique OS2006. L'âge médian était de 15,5 ans (min=5; max=51). Sur 276 patients âgés de moins de 25 ans, 253 ont débuté leur chimiothérapie préopératoire avec un schéma à base de MTX. Des échantillons de sang sur buvard étaient disponibles pour l'extraction d'ADN constitutionnel pour 191/253 patients. Après contrôle qualité, 4/191 patients présentaient un génotypage de qualité insuffisante et 3/96 SNP ne satisfaisaient pas aux critères qualité minimale de génotypage décrits précédemment : 1 SNP avait un *call rate* inférieur à 90% (traduisant le fait que moins de 90% des patients avaient été génotypés correctement pour ce SNP) et 2 SNP présentaient un écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Au total, 187 patients (100 hommes, 87 femmes, âge médian 14,2 ans) avec un suivi médian de 3,8 ans (min=0,3; max=7,4) ont été inclus dans l'analyse pharmacogénétique (**Figure 17**).

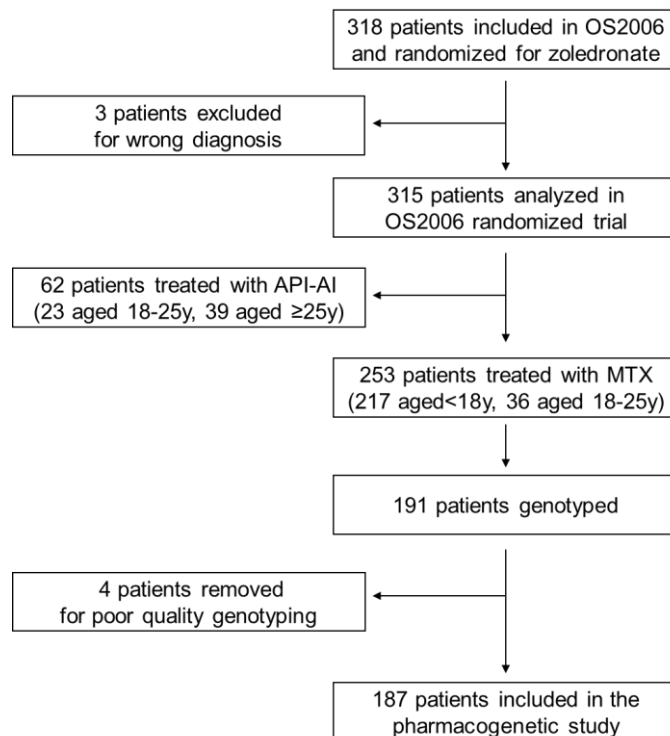


Figure 17 : Diagramme de flux des patients inclus dans l'essai Clinique OS2006 et génotypés pour l'analyse pharmacogénétique du méthotrexate (MTX).

Les caractéristiques cliniques, histologiques et thérapeutiques des 187 patients inclus dans l'analyse pharmacogénétique sont rapportées dans le **Tableau 13** et comparées à celles des 66 patients traités par MTX mais non inclus dans l'analyse. Quatre-vingt-huit patients ont été randomisés sans zolédronate et 99 avec. Une bonne réponse histologique a été observée chez 117/164 patients opérés après une chimiothérapie préopératoire (71%, Figure-S1). La PFS à 3 ans était de 65% (IC95%=58-73). Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes caractéristiques des patients inclus et non inclus dans l'analyse pharmacogénétique.

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques, histologiques et thérapeutiques des 253 patients inclus dans l'essai clinique randomisé OS2006, ayant débuté leur chimiothérapie préopératoire avec un schéma à base de méthotrexate (MTX), et inclus ou non dans l'analyse pharmacogénétique du MTX.

	Patients included in pharmacogenetic study (n= 187)	Patients not included in pharmacogenetic study (n= 66)	p-value*
Sex			
- Male	100 (53.5%)	37 (56.1%)	0.72
- Female	87 (46.5%)	29 (43.9%)	
Age (years)			
- Mean [range]	14.1 [6.4 ; 24.5]	14.7 [5.8 ; 23.3]	0.27
- [5.8 ; 12[	55 (29.4%)	19 (28.8%)	0.54
- [12 ; 18[	108 (57.8%)	35 (53.0%)	
- [18 ; 25[	24 (12.8%)	12 (18.2%)	
Histology			
- Osteoblastic common form	101 (54.0%)	33 (50%)	0.21
- Fibroblastic common form	12 (6.4%)	3 (4.5%)	
- Chondroblastic common form	30 (16.0%)	5 (7.6%)	
- Common form without precision	29 (15.5%)	17 (25.8%)	
- Giant cells	2 (1.1%)	1 (1.5%)	
- Telangiectatic	6 (1.9%)	6 (9.1%)	
- Juxtacortical or parosteal low-grade	0	0	
- Surface high-grade	1 (0.3%)	0	
- Well-differentiated	1 (0.3%)	0	
- Other	4 (1.3%)	0	
- Not available	1 (0.3%)	1 (1.5%)	
Metastatic status			
- No metastasis	122 (65.2%)	49 (74.2%)	0.39
- Suspicious lesions	33 (17.6%)	8 (12.1%)	
- Metastases	32 (17.1%)	9 (13.6%)	
Surgery of primitive tumor			
- No surgery	5 (2.7%)	4 (6.1%)	0.20
- Surgery	182 (97.3%)	62 (93.9%)	
Histological response			
- Good response (<10% viable cells)	129 (70.9%)	43 (65.1%)	0.43
- Poor response (≥10% viable cells)	53 (29.1%)	19 (28.8%)	
- Not evaluable	5	4	
Risk group			
- Non metastatic and resectable	152 (81.3%)	57 (86.4%)	0.35
- Metastatic or non resectable	35 (18.7%)	9 (13.6%)	
Randomization arm			
- Without Zoledronate	99 (52.9%)	26 (39.4%)	0.14
- With Zoledronate	88 (47.1%)	40 (60.6%)	
Median follow-up	3.8 y	4.7 y	0.22
Events	67	27	
- Progression / Relapse	66	26	
- Second Malignancy	0	0	
- Death as first event	1	1	
5 y Event-free survival [95%CI]	59.6% [51.6;67.1]	56.1% [43.2;68.2]	0.28

*: les tests du Chi² et de Student ont été utilisés pour les variables catégorielles et continues, respectivement. Le suivi médian a été calculé par la méthode de Kaplan-Meier inversée. Les survies ont été comparées par le test du log-rank.

Analyses d'efficacité

a- Réponse histologique

L'analyse d'association entre SNP et réponse histologique a été réalisée sur l'échantillon des 164 patients traités par une chimiothérapie première à base de MTX, n'ayant pas eu de changement de chimiothérapie en pré-opératoire pour API-AI et ayant pu être opérés de leur tumeur primitive. Parmi ces 164 patients, 117 avaient une bonne réponse histologique c'est-à-dire présentaient moins de 10% de cellules résiduelles viables dans la pièce opératoire (**Figure 18**).

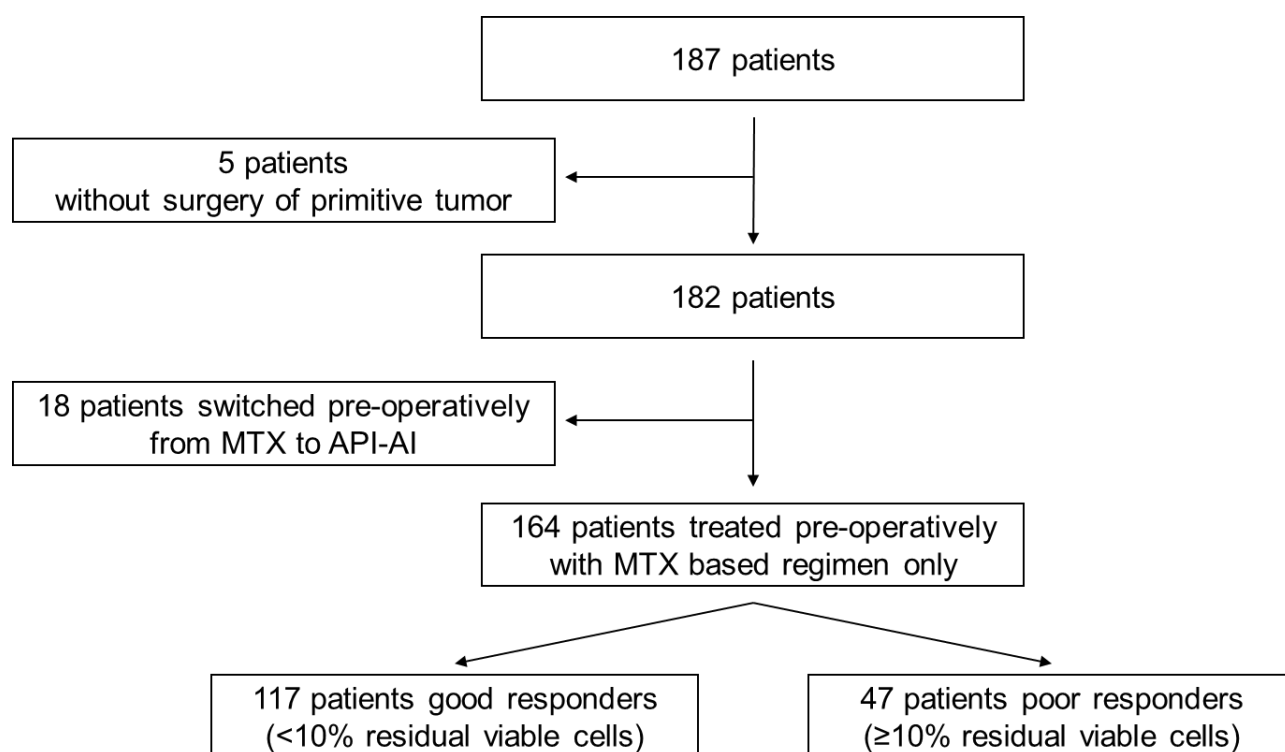


Figure 18 : Diagramme de flux pour l'analyse d'association entre SNP et réponse histologique pour les 187 patients inclus dans l'analyse pharmacogénétique et

MTX: Méthotrexate ; VP: étoposide ; IFO: ifosfamide.

La première étape de l'analyse d'association a permis de présélectionner 5 SNP (rs4148326, rs408626, rs776746, rs11075291 et rs35592) dans 4 gènes (UGT1A, DHFR, CYP3A5, ABCC1) significativement associés à la réponse histologique au seuil 0,05 (**Figure 19, Tableau 14**). D'après les données 1000 génomes (population européenne), les SNP rs11075291 et rs35592 situés dans le gène ABCC1 étaient peu corrélés entre eux ($r^2 < 0.55$). Parmi ces 5 SNP, quatre ont été sélectionnés car restant significativement associés à la réponse histologique dans plus de 60% des échantillons obtenus par *bootstrap* (min=65,4% ; max=84,7%) (**Tableau 14**). Ont été retenus comme modèles génétiques, le modèle additif pour les SNP rs4148326, rs776746 et rs35592 et le codage récessif pour le SNP rs408626. Dans la mesure où des résultats similaires ont été obtenus en considérant l'âge comme une variable catégorielle ou continue (différence maximale de l'AIC=1,18), le codage continu a été conservé pour la suite de l'analyse car le plus parcimonieux.

Dans la seconde étape, les 4 SNP sélectionnés ont été introduits dans le même modèle multivarié ajusté sur l'âge au diagnostic, le sexe et le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate). La procédure descendante de sélection de variable (procédure *backward*) a abouti à la sélection finale de 3 SNP: rs4148326 (OR=0,41, IC95%=[0,21-0,74]), rs776746 (OR=2,43 [1,24-4,96]) et rs408626 (OR=3,45 [1,33-9,09]) (**Tableau 17**).

Les performances du modèle ont été évaluées par le test de Hosmer-Lemeshow à 10 classes et l'aire sous la courbe ROC (AUC). La non significativité du test de Hosmer-Lemeshow ($p=0,10$) indique un bon ajustement aux données, tandis que l'AUC estimée à 0,72 (IC95%=0,63-0,81) indique une bonne capacité discriminante, y compris après application d'une correction par *bootstrap* (AUC=0,69). Comparativement au modèle clinique, le modèle pharmacogénétique (incluant les 3 SNP retenus au terme de l'analyse d'association) est plus performant avec une meilleure capacité de discrimination (AUC du modèle clinique =0,57 [0,47-0,68], $p=0,012$, **Figure 20**).

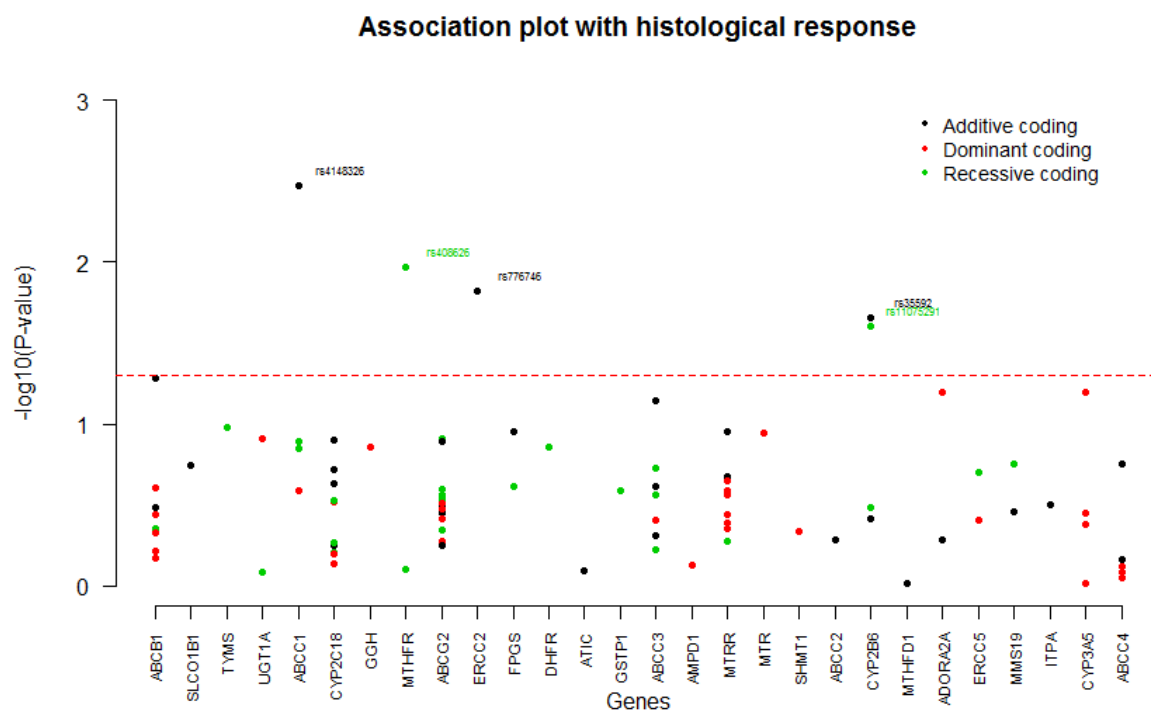


Figure 19 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et réponse histologique.

Ont été reportées en ordonnées les p-valeurs de l'analyse d'association ($-\log_{10} p\text{-values}$) entre les SNP (testés indépendamment) et la réponse histologique (critère binaire, $<$ vs. $\geq 10\%$ de cellules résiduelles viables) calculées par régression logistique ajustée sur l'âge au diagnostic, le sexe et le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate). La ligne rouge horizontale en pointillés représente le seuil de significativité fixée à 0,05. Chaque SNP correspond à un point. La couleur du point correspond au modèle génétique retenu pour la présentation des résultats (modèle additif en noir, dominant en rouge et récessif en vert). Pour chaque SNP, la p-valeur reportée correspond à celle du modèle additif s'il est significativement associé à la réponse histologique, ou à défaut à la plus petite des p-valeurs des trois modèles testés. Les SNP sont classés en abscisse par gène.

Tableau 14 : Description des 5 SNP significativement associés à la réponse histologique.

SNP	Chr	chr_pos	local_loci	Alleles (Maj/Min)	MAF	Call rate	HWE	Genetic model	Estimate	Std.Error	p-value	Bootstrap
rs4148326	2	233764816	UGT1A	A/G	0.48	0.93	0.53	ADD	-0.85	0.29	0.0034	84.7%
								DOM	-1.14	0.39	0.0037	82.9%
rs408626	5	80655314	DHFR	C/T	0.42	1	0.54	REC	1.14	0.45	0.011	72.2%
rs776746	7	99672916	CYP3A5	C/T	0.14	0.98	0.051	ADD	0.74	0.31	0.015	67.3%
								REC	2.86	1.10	0.0093	52.3%
rs11075291	16	16004618	ABCC1	A/G	0.40	1	0.60	REC	1.00	0.45	0.025	58.8%
rs35592	16	16047966	ABCC1	T/C	0.23	0.97	0.94	ADD	0.67	0.29	0.022	65.4%
								REC	2.05	0.85	0.015	59.0%

Chr: chromosome. Chr pos: position chromosomique (GRCh38.p2). MAF: fréquence de l'allèle mineur. HWE: p-value du test de l'équilibre Hardy-Weinberg. ADD: modèle additif. DOM: modèle dominant. REC: modèle récessif. Estimate: coefficient de regression (=log odds ratio) estimée par le modèle de régression logistique ajusté sur l'âge au diagnostic, le sexe et le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate). P-value: p-value de l'analyse d'association calculée par le test de Wald. Bootstrap: proportion des 1000 échantillons obtenus par bootstrap dans lesquels les SNP sélectionnés restent significativement associés à la réponse histologique au seuil 0,05

Tableau 15 : Modèle pharmacogénétique multivarié modélisant la probabilité de mauvaise réponse histologique.

Sont reportés dans ce tableau les odds ratios (OR) avec leur intervalle de confiance (CI) et les p-valeurs correspondantes pour les SNP (rs4148326 et rs776746 en additif, rs408626 en récessif) et les covariables cliniques (âge au diagnostic en continu, sexe et bras de randomisation).

	Estimate	OR	[95%CI]	p-value
rs4148326	-0.89	0.41	0.21-0.74	0.0047
rs776746	0.89	2.43	1.24-4.96	0.012
rs408626	1.24	3.45	1.33-9.09	0.011
Sex (ref= female)	-0.31	0.73	0.33-1.61	0.44
Age	0.094	1.10	0.98-1.24	0.11
Zoledronate (ref=no)	-0.13	0.88	0.10-1.91	0.75

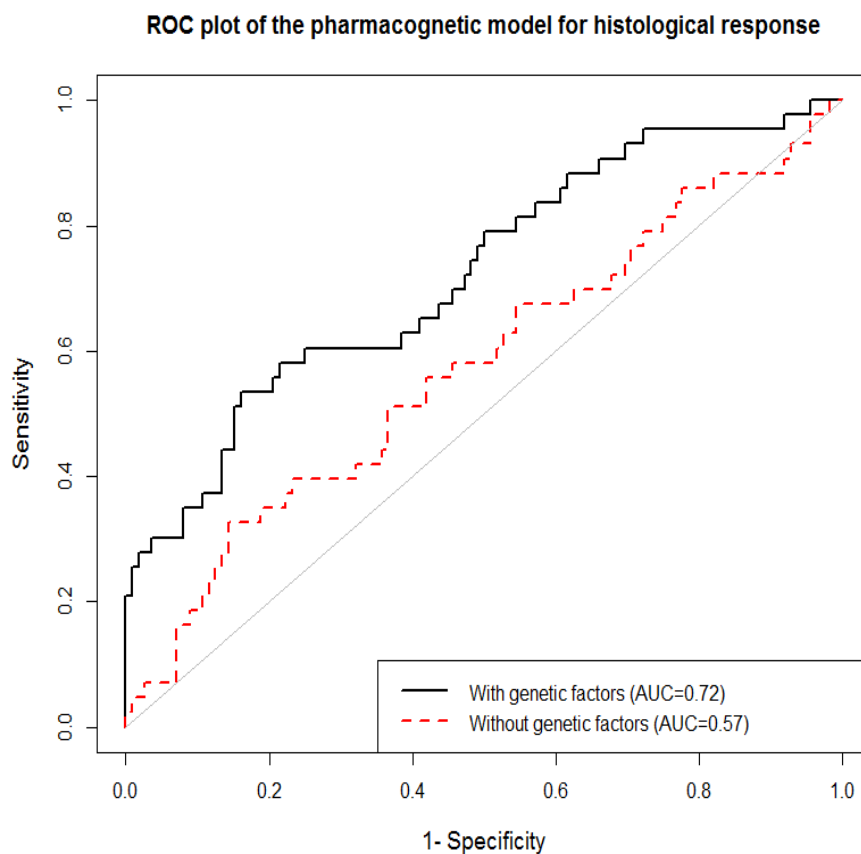


Figure 20 : Courbes ROC.

Sont représentées la courbe ROC du modèle pharmacogénétique modélisant la probabilité de mauvaise réponse histologique et incluant 3 SNP (rs4148326, rs776746 et rs408626) et les covariables cliniques (âge au diagnostic en continu, sexe et bras de randomisation), et la courbe ROC du modèle clinique (âge au diagnostic en continu, sexe et bras de randomisation). Les aires sous la courbe (AUC) des courbes ROC sont reportées sur la figure et ont été comparées par la méthode de DeLong ($p=0,012$).

b- Survie sans progression(PFS)

L'analyse d'association entre SNP et PFS a été réalisée sur l'ensemble des 187 patients traités par une chimiothérapie première à base de MTX. Parmi ces 187 patients, 67 évènements ont été observés.

La première étape de l'analyse d'association a permis de présélectionner 9 SNP (rs1805087, rs4148326, rs2235048, rs6961665, rs10267099, rs11545078, rs17562516, rs2099361 et rs707265) significativement associés à la réponse histologique au seuil 0,05 (**Figure 21**, **Tableau 16**). D'après les données 1000 génomes (population européenne), les SNP rs2235048, rs6961665 et rs10267099 situés dans le gène ABCB1 étaient peu corrélés entre eux ($r^2 < 0.43$), contrairement aux SNP rs2099361 et rs707265 situés dans le gène CYP2B6 (r^2 variant de 0.73 en sous-population finlandaise, FIN, à 0.83 en population hispanique, IBS). Parmi ceux-ci, 7 SNP (rs4148326, rs2235048, rs6961665, rs10267099, rs11545078, rs17562516 et rs2099361) ont été sélectionnés car restant significativement associés à la réponse histologique dans plus de 60% des échantillons obtenus par *bootstrap* (min=60,4%; max=84,5%) (**Tableau 16**). Ont été retenus comme modèles génétiques, le modèle additif pour 4 SNP (rs2235048, rs6961665, rs11545078 et rs2099361), dominant pour 2 SNP (rs4148326 et rs17562516) et récessif pour 1 SNP (rs10262670). Dans la mesure où des résultats similaires ont été obtenus en considérant l'âge comme une variable catégorielle ou continue, le codage continu a été conservé pour la suite de l'analyse car le plus parcimonieux.

Dans la seconde étape, les 7 SNP sélectionnés (dont 3 dans ABCB1 mais en faible déséquilibre de liaison et 1 dans CYP2B6) ont été introduits dans le même modèle multivarié ajusté sur l'âge au diagnostic, le sexe, le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate) et le groupe de risque (risque faible, maladie localisée et opérable de manière complète, risque élevé: maladie métastatique ou non complètement opérable). La procédure descendante de sélection

de variable (procédure *backward*) a abouti à la sélection finale de 4 SNP: rs2235048 (HR=0,65 [0,44; 0,97]), rs4148326 (HR=0,39 [0,22; 0,66]), rs17562516 (HR=1,84 [1,10; 3,09]) et rs10267099 (HR=3,77 [1,28; 11,7]) (**Tableau 17**).

Les performances du modèle pharmacogénétique ont été évaluées par la statistique r^2 de Kent et O'Quigley et la statistique c de Uno. Comparativement au modèle clinique (incluant les covariables âge au diagnostic, sexe, bras de randomisation et groupe de risque), les performances du modèle pharmacogénétique étaient meilleures ($r^2=0,36$ et $c=0,72$ pour le modèle pharmacogénétique vs. $r^2=0,14$ et $c=0,62$ pour le modèle clinique).

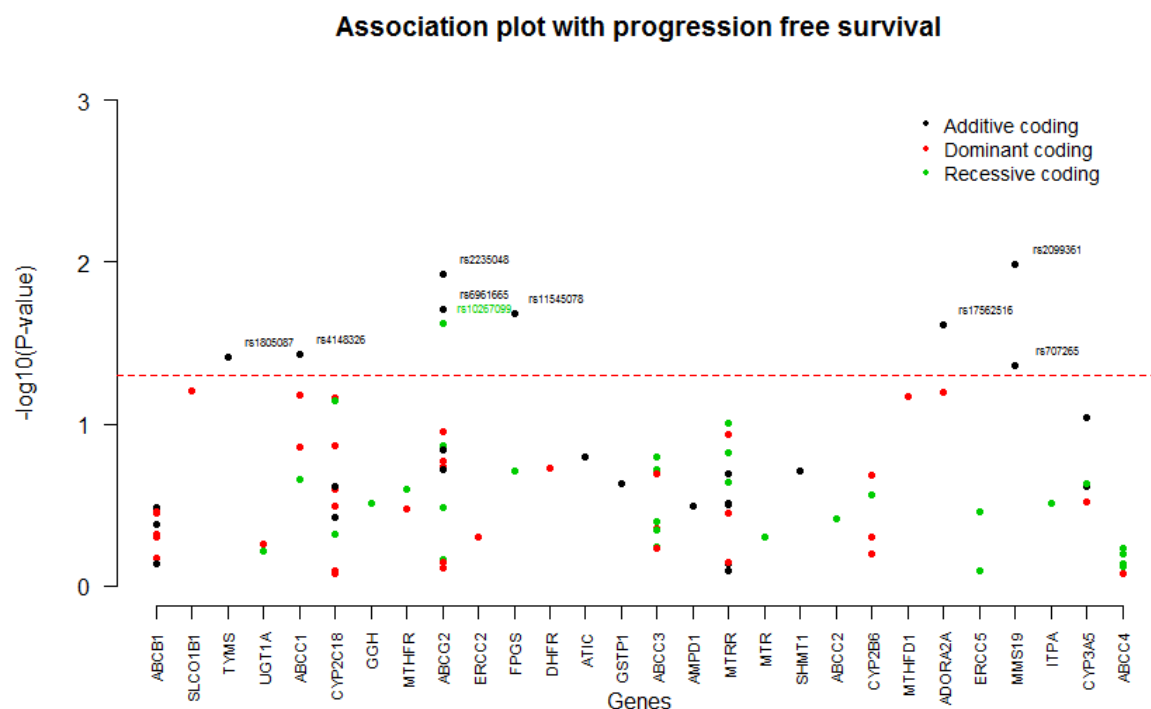


Figure 21 : Résultats de l’analyse d’association entre SNP et survie sans progression (PFS).

Ont été reportées en ordonnées les p-valeurs de l’analyse d’association ($-\log_{10} p\text{-values}$) entre les SNP (testés indépendamment) et la PFS calculées par un modèle de Cox ajusté sur l’âge au diagnostic, le sexe, le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate) et le groupe de risque (risque faible, maladie localisée et opérable de manière complète, risque élevé: maladie métastatique ou non complètement opérable). La ligne rouge horizontale en pointillés représente le seuil de significativité fixée à 0,05. Chaque SNP correspond à un point. La couleur du point correspond au modèle génétique retenu pour la présentation des résultats (modèle additif en noir, dominant en rouge et récessif en vert). Pour chaque SNP, la p-valeur reportée correspond à celle du modèle additif s’il est significativement associé à la PFS, ou à défaut à la plus petite des p-valeurs des trois modèles testés. Les SNP sont classés en abscisse par gène.

Tableau 16 : Description des 9 SNP significativement associés à la survie sans progression (PFS).

SNP	chr	chr_pos	local_loci	Alleles (Maj/Min)	MAF	Call rate	HWE	Genetic model	Estimate	Std.Error	p-value	Bootstrap
rs1805087	1	236885200	MTR	T/C	0.15	1	0.35	ADD	0.44	0.21	0.039	53.8%
								REC	1.05	0.53	0.047	48.6%
rs4148326	2	233764816	UGT1A	A/G	0.48	0.95	0.53	ADD	-0.40	0.19	0.037	53.7%
								DOM	-0.79	0.27	0.0029	84.5%
rs2235048	7	87509195	ABCB1	A/G	0.42	1	0.89	ADD	-0.49	0.19	0.012	72.0%
								DOM	-0.64	0.26	0.013	69.3%
rs6961665	7	87552102	ABCB1	T/G	0.50	1	0.023	ADD	-0.48	0.21	0.020	62.3%
								REC	-0.72	0.28	0.0096	70.0%
rs10267099	7	87649444	ABCB1	A/G	0.23	1	0.11	REC	1.18	0.52	0.024	61.1%
rs11545078	8	63026205	GGH	G/A	0.083	1	0.78	ADD	0.63	0.27	0.021	60.4%
								DOM	0.64	0.30	0.031	56.2%
rs17562516	17	50652420	ABCC3	T/A	0.24	0.98	0.76	ADD	0.45	0.20	0.024	58.6%
								DOM	0.59	0.25	0.019	64.4%
rs2099361	19	40992443	CYP2B6	G/A	0.29	0.99	0.19	ADD	0.51	0.20	0.010	70.6%
								DOM	0.53	0.26	0.037	54.5%
rs707265	19	41018182	CYP2B6	C/T	0.33	0.99	0.17	REC	0.86	0.41	0.036	56.6%
								ADD	0.39	0.19	0.044	54.2%

Chr: chromosome. Chr pos: position chromosomique (GRCh38.p2). MAF: fréquence de l'allèle mineur. HWE: p-value du test de l'équilibre Hardy-Weinberg. ADD: modèle additif. DOM: modèle dominant. REC: modèle récessif. Estimate: coefficient de regression (=log hazard ratio) estimée par le modèle de Cox ajusté sur l'âge au diagnostic, le sexe, le bras de randomisation (indicatrice de traitement par zoledronate) et le groupe de risque (risque faible, maladie localisée et opérable de manière complète, risque élevé: maladie métastatique ou non complètement opérable). P-value: p-value de l'analyse d'association calculée par le test de Wald. Bootstrap: proportion des 1000 échantillons obtenus par bootstrap dans lesquels les SNP sélectionnés restent significativement associés à la PFS au seuil 0,05.

Tableau 17 : Modèle pharmacogénétique multivarié pour la survie sans progression (PFS).

Sont reportés dans ce tableau les hazard ratios (HR) avec leur intervalle de confiance (CI) et les p-valeurs correspondantes pour les SNP (rs2235048 en additif, rs4148326 et rs17562516 en dominant, rs10267099 en récessif) et les covariables cliniques (âge au diagnostic en continu, sexe, bras de randomisation et groupe de risque : risque faible, maladie localisée et opérable de manière complète, risque élevé: maladie métastatique ou non complètement opérable).

	Estimate	HR	[95%CI]	p-value
rs2235048	-0.42	0.65	0.44-0.97	0.034
rs4148326	-0.95	0.39	0.22-0.66	0.00055
rs17562516	0.61	1.84	1.10-3.09	0.021
rs10267099	1.33	3.77	1.28-11.7	0.016
Sex (ref=female)	-0.29	0.75	0.44-1.26	0.27
Age	-0.011	0.99	0.92-1.07	0.77
Zoledronate (ref=no)	0.070	1.07	0.63-1.82	0.80
Risk group (ref=low-risk)	1.33	3.78	2.19-6.52	0.000002

Analyses de toxicité

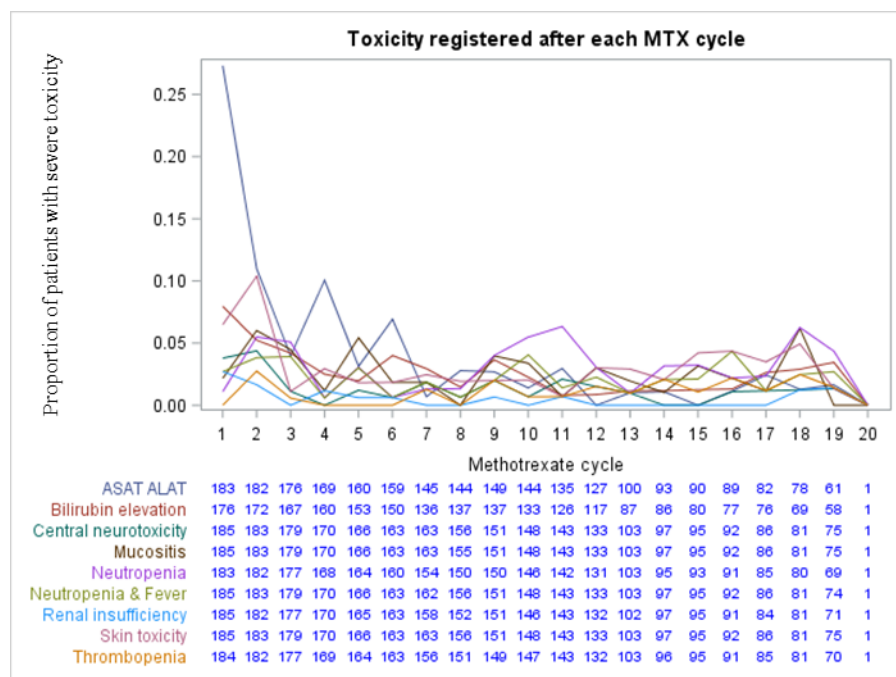
Au total, 2587 cures de MTX ont été administrées à 187 patients (nombre médian de cures de MTX par patient=15, min=1 ; max=20). Une réduction de dose a été appliquée pour 243/2587 cures de MTX chez 56/187 patients (réduction moyenne de dose =31%, min=20% ; max=47%). Les données de toxicité aiguë liées au MTX étaient disponibles pour 185 patients et 2298 à 2570 cures selon le type de toxicité (**Tableau 18**). Pour chaque type de toxicité, le nombre de cures de MTX compliquées de toxicité sévère et le nombre de patients ayant présenté au moins une toxicité sévère sont détaillés dans le **Tableau 18**. La **Figure 22** représente pour chaque type de toxicité l'évolution dans le temps (par cure de MTX) de la proportion de patients ayant présenté une toxicité sévère et le grade moyen de toxicité observé.

Tableau 18 : Fréquence des épisodes de toxicités aiguës sévères liées au méthotrexate (MTX) pour l'ensemble des cures de MTX et par patient.

Le grade maximal de chaque type de toxicité aiguë a été calculée pour chaque patient pour l'ensemble du traitement par MTX, et a été binarisé comme suit pour définir les toxicités sévères: augmentation de ASAT/ALAT et toxicité hématologique ($\leq$, $\geq$ grade 4), mucite ($\leq$, $\geq$ grade 3), augmentation de la bilirubine, insuffisance rénale, toxicité cutanée, toxicité neurologique centrale et neutropénie fébrile ($\leq$, $\geq$ grade 2).

	Nb MTX cycles with severe toxicity / Nb MTX cycles with available data (%)	Nb patients with ≥ 1 severe toxicity / Nb patients with available data (%)	Median number (min-max) of severe toxicities per patient	Nb patients with ≥ 2 severe toxicities
ASAT/ALAT ($\geq$grade-4)	132 / 2467 (5.35%)	76 / 185 (41.08%)	1 (1-15)	29
Neutropenia ($\geq$grade-4)	78 / 2524 (3.09%)	54 / 185 (29.19%)	1 (1-5)	17
Thrombopenia ($\geq$grade-4)	25 / 2539 (0.98%)	23 / 185 (12.43%)	1 (1-2)	2
Mucositis ($\geq$grade-3)	70 / 2569 (2.72%)	50 / 185 (27.03%)	1 (1-5)	13
Bilirubin increase ($\geq$grade-2)	69 / 2298 (3.00%)	37 / 184 (20.11%)	1 (1-6)	14
Renal insufficiency ($\geq$grade-2)	16 / 2546 (0.63%)	15 / 185 (8.11%)	1 (1-2)	1
Skin toxicity ($\geq$grade-2)	83 / 2570 (3.23%)	44 / 185 (23.78%)	1 (2-6)	23
Central neurologic toxicity ($\geq$grade-2)	38 / 2570 (1.48%)	31 / 185 (16.76%)	1 (1-4)	5
Febrile neutropenia ($\geq$grade-2)	58 / 2568 (2.26%)	47 / 185 (25.41%)	1 (1-3)	10

A



B

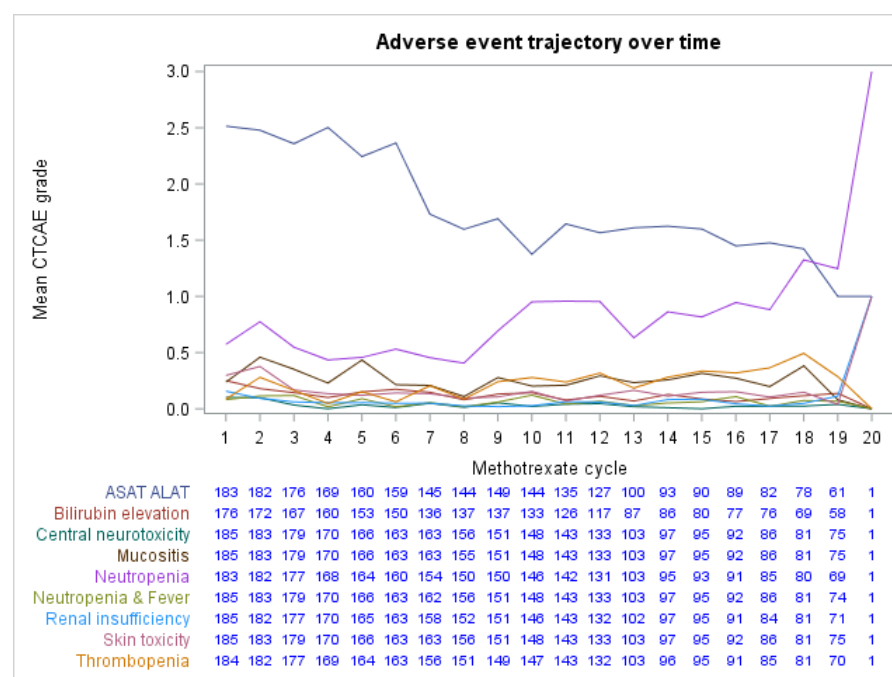


Figure 22 : Description de la toxicité aiguë liée au méthotrexate (MTX) au cours du temps.

A) Evolution dans le temps (par cure de MTX) de la proportion de patients ayant présenté une toxicité aiguë sévère.

B) Evolution dans le temps (par cure de MTX) du grade moyen de toxicité aiguë observé.

Dans l'analyse principale par régression logistique, nous avons considéré pour chaque type de toxicité étudiée, la survenue d'au moins un épisode de toxicité aiguë sévère. Nous avons ainsi pu identifier 19 SNP dans 9 gènes (ABCB1, ABCG2, SLCO1B1, UGT1A, ABCC1, CYP2B6, CYP2C18, DHFR, ERCC5) significativement associés à la survenue d'au moins une toxicité aiguë sévère au seuil 0,01 (8 SNP avec un modèle additif, 4 en dominant et 8 en récessif) (**Figure 23, Tableau 19**). Un seul SNP (rs13137622 dans le gène ABCG2) était associé de manière significative à deux toxicités différentes (insuffisance rénale et toxicité cutanée). En outre, quatre gènes comportaient des SNP significativement associés à des toxicités différentes : ABCB1, ABCG2, UGT1A et SLCO1B1. Ainsi 7 SNP dans le gène ABCB1 étaient significativement associés soit à une augmentation des ASAT/ALAT soit à une neurotoxicité centrale (dont 2 SNP fortement corrélés, avec $r^2=1,00$), 3 SNP dans le gène ABCG2 étaient significativement associés soit à une insuffisance rénale soit à une toxicité cutanée ($r^2<0,80$), 2 SNP dans UGT1A étaient significativement associés soit à une élévation de la bilirubine soit à une mucite ($r^2=0,47$), et 2 SNP dans SLCO1B1 étaient significativement associés soit à une neutropénie fébrile soit à une toxicité cutanée ($r^2=0,02$).

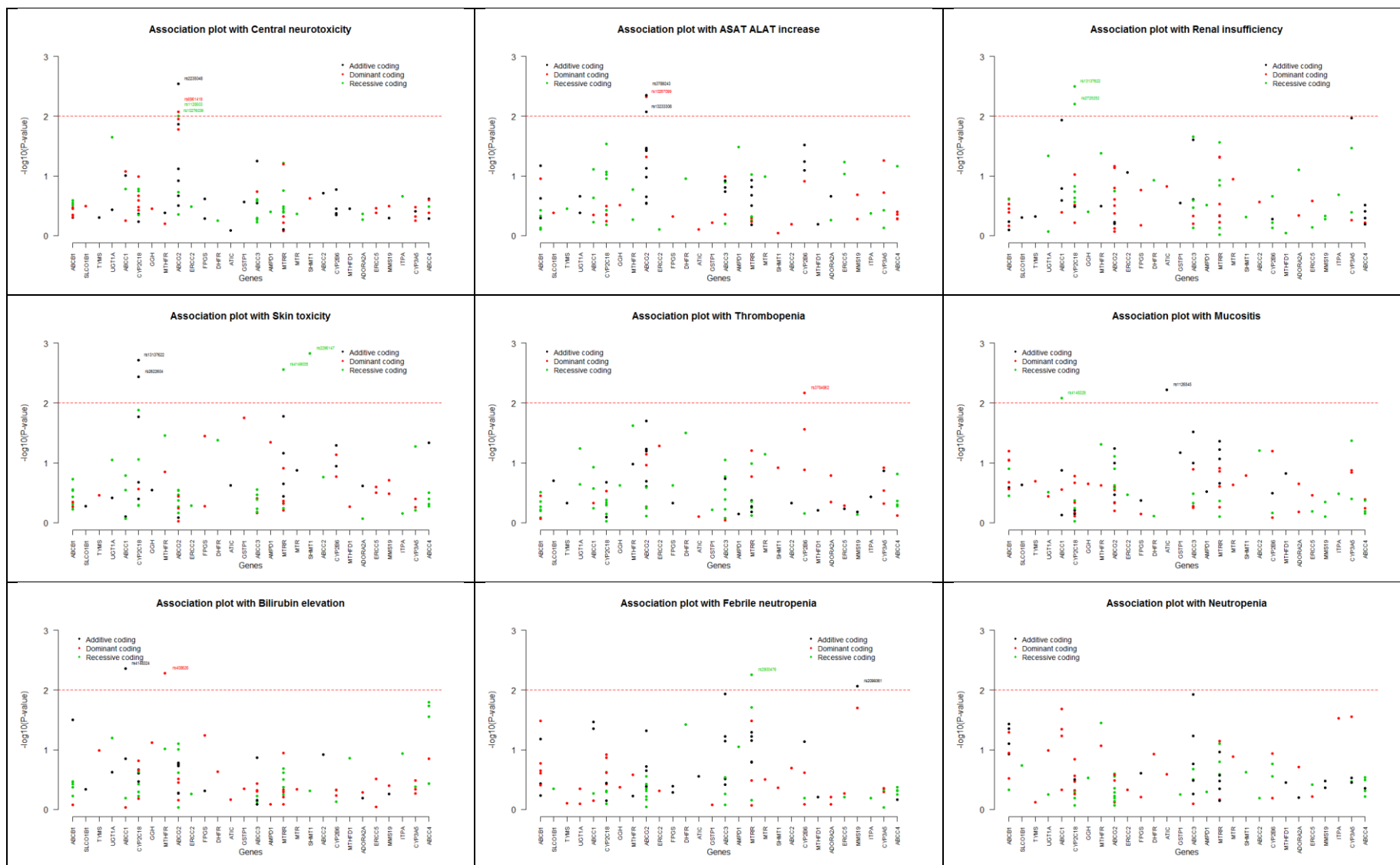


Figure 23 : Résultats de l'analyse d'association entre SNP et survenue d'au moins un épisode de toxicité aiguë sévère au méthotrexate (MTX).

Tableau 19 : Description des 19 SNP significativement associés à la survenue d’au moins un épisode de toxicité aiguë sévère secondaire à une cure de méthotrexate (MTX).

Analyse réalisée à l’aide de modèles de régression logistique ajustés sur l’âge au diagnostic (covariable continue), le sexe, le nombre de patients inclus dans le centre (covariable binaire <, ≥ 10 patients inclus), le bras de randomisation (zolédronate oui/non) et le nombre de cures de MTX administrées à dose pleine. Le seuil de significativité des tests a été fixé à 0,01.

Toxicity	SNP	Chromosome	Gene	p-value		
				Additive	Dominant	Recessive
Central neurotoxicity	rs2235048	7	ABCB1	0.003	0.055	0.004
	rs6961419	7	ABCB1	0.054	0.008	0.877
	rs1128503	7	ABCB1	0.011	0.109	0.010
	rs10276036	7	ABCB1	0.012	0.119	0.010
ASAT ALAT increase	rs3789243	7	ABCB1	0.004	0.030	0.014
	rs13233308	7	ABCB1	0.009	0.082	0.007
	rs10267099	7	ABCB1	0.022	0.005	0.422
Renal insufficiency	rs2725252	4	ABCG2	0.042	0.646	0.006
	rs13137622	4	ABCG2	0.116	0.937	0.003
Skin toxicity	rs13137622	4	ABCG2	0.002	0.039	0.001
	rs2622604	4	ABCG2	0.004	0.006	0.111
	rs4149035	12	SLCO1B1	0.011	0.163	0.003
	rs2296147	13	ERCC5	0.065	0.986	0.001
Thrombopenia	rs3784862	16	ABCC1	0.056	0.007	0.487
Mucositis	rs4148326	2	UGT1A	0.017	0.217	0.008
	rs1126545	10	CYP2C18	0.006	0.011	1.000
Bilirubin elevation	rs4148324	2	UGT1A	0.004	0.034	0.009
	rs408626	5	DHFR	0.071	0.005	0.887
Febrile neutropenia	rs2900476	12	SLCO1B1	0.074	0.473	0.006
	rs2099361	19	CYP2B6	0.009	0.008	0.394

Dans une approche complémentaire et exploratoire par régression de Poisson, nous avons considéré pour chaque type de toxicité étudiée, le nombre d'épisodes de toxicité aiguë sévère. Nous avons restreint l'analyse aux toxicités pour lesquelles plusieurs épisodes étaient observés chez un nombre suffisant de patients : augmentation des ASAT/ALAT (29 patients avaient présenté au moins 2 épisodes de toxicité hépatique sévère sur 76 ayant présenté au moins 1 épisode de toxicité hépatique sévère, $29/76=38\%$), neutropénie ($17/54=31\%$), augmentation de la bilirubine ($14/37=37\%$) et toxicité cutanée ($23/44=52\%$) (**Tableau 18**). Nous avons ainsi pu identifier 39 SNP dans 17 gènes significativement associés à la répétition des épisodes de toxicité aiguë sévère: 15 SNP associés à une augmentation des ASAT/ALAT, 14 à une élévation de la bilirubine, 14 à une toxicité cutanée et 3 à une neutropénie (**Tableau 24****Figure 24**, **Tableau 20**). Sept SNP étaient significativement associés à différentes toxicités. Seuls 6 SNP identifiés dans l'analyse principale en régression logistique étaient associés aux mêmes toxicités en régression de Poisson (4 SNP associés à la toxicité cutanée et 2 SNP associés à l'augmentation de la bilirubine). Les 33 autres SNP n'avaient pas été identifiés comme significativement associés à la toxicité aiguë sévère en régression logistique.

Tableau 20 : Description des 39 SNP significativement associés à la répétition des épisodes de toxicité aiguë sévère au méthotrexate (MTX).

Analyse restreinte aux toxicités pour lesquelles plusieurs épisodes étaient observés chez un nombre suffisant de patients : augmentation des ASAT/ALAT, neutropénie, augmentation de la bilirubine et toxicité cutanée. Analyse réalisée à l'aide de modèles de Poisson ajustés sur l'âge au diagnostic (covariable continue), le sexe, le nombre de patients inclus dans le centre (covariable binaire $<, \geq 10$ patients inclus), le bras de randomisation (zolédronate oui/non) et le nombre de cures de MTX administrées à dose pleine. Le seuil de significativité des tests a été fixé à 0,01.

Toxicity	SNP	Chromosome	Gene	p-value		
				Additive	Dominant	Recessive
ASAT ALAT increase	rs4846048	1	MTHFR	0.00003	0.005	5.1E-06
	rs1476413	1	MTHFR	0.023	0.005	0.50
	rs17421511	1	MTHFR	0.00006	0.00004	0.81
	rs4846052	1	MTHFR	0.011	0.15	0.004
	rs1126545	10	CYP2C18	0.009	0.005	0.99
	rs246240	16	ABCC1	0.009	0.011	0.99
	rs2847149	18	TYMS	0.013	0.41	0.0007
	rs6084304	20	ITPA	0.031	0.93	8.8E-05
	rs8362	20	ITPA	0.005	0.62	2.8E-08
	rs6037506	20	ITPA	0.009	0.003	0.28
	rs6139034	20	ITPA	0.001	0.20	2.3E-08
	rs1564481	4	ABCG2	0.16	0.66	0.0002
	rs2725252	4	ABCG2	0.24	0.007	0.27
	rs1801394	5	MTRR	0.021	0.004	0.60
	rs11545078	8	GGH	0.34	0.22	0.0004
Skin toxicity	rs1695	11	GSTP1	0.009	0.004	0.30
	rs2417955	12	SLCO1B1	0.006	0.05	0.009
	rs4149035	12	SLCO1B1	0.0006	0.036	0.0002
	rs4149057	12	SLCO1B1	0.004	0.039	0.008
	rs1463565	12	SLCO1B1	0.0001	0.0001	0.047
	rs11045872	12	SLCO1B1	0.007	0.033	0.009
	rs2296147	13	ERCC5	0.0004	0.43	1.9E-07
	rs3784862	16	ABCC1	0.004	0.005	0.15
	rs246240	16	ABCC1	0.002	0.002	0.99
	rs2372536	2	ATIC	0.37	0.012	0.007
	rs13137622	4	ABCG2	0.001	0.022	0.002

	rs2622604	4	ABCG2	0.001	0.0004	0.50
	rs1643650	5	DHFR	0.72	0.25	0.006
	rs408626	5	DHFR	0.12	0.81	0.001
Bilirubin elevation	rs4846048	1	MTHFR	0.0002	0.004	0.0003
	rs17421511	1	MTHFR	0.50	0.87	0.001
	rs13181	19	ERCC2	0.15	0.85	0.004
	rs4148324	2	UGT1A	0.0093	0.15	0.001
	rs4148326	2	UGT1A	0.030	0.40	0.008
	rs6084304	20	ITPA	0.004	0.0002	0.63
	rs8362	20	ITPA	0.037	0.009	0.82
	rs3761422	22	ADORA2A	0.0009	0.067	0.0001
	rs2267076	22	ADORA2A	0.001	0.017	0.003
	rs2236624	22	ADORA2A	0.0005	0.014	0.0002
	rs2622621	4	ABCG2	0.21	0.91	0.008
	rs3114018	4	ABCG2	0.39	0.19	0.009
	rs1801394	5	MTRR	0.018	0.0036	0.57
	rs408626	5	DHFR	0.056	0.0085	0.74
Febrile neutropenia	rs3740065	10	ABCC2	0.34	0.22	0.0004
	rs4149026	12	SLCO1B1	0.045	0.17	0.005
	rs10929303	2	UGT1A	0.0450	0.49	0.002

DISCUSSION

L'analyse pharmacogénétique ici rapportée a permis d'identifier des associations entre des polymorphismes génétiques et des critères d'efficacité et de toxicité de la chimiothérapie par MTX à haute dose dans l'essai clinique randomisé OS2006. Ainsi 3 SNP ont été montrés comme significativement associés à la réponse histologique (rs4148326 localisé dans le gène UGT1A, rs776746 dans CYP3A5 et rs408626 dans DHFR) et 4 à la survie sans progression (rs4148326 dans UGT1A, rs2235048 et rs10267099 dans ABCB1 et rs17562516 dans ABCC3). Un de ces SNP (rs4148326 dans UGT1A) a été retrouvé significativement associé à la fois à la réponse histologique et à la PFS. L'allèle mineur G de ce SNP apparaît ainsi protecteur, autrement dit associé à un risque moindre de mauvaise réponse histologique (OR=0,41, IC 95%=[0,21-0,74], $p=0,005$) et à un risque moindre d'évènements en terme de PFS (HR=0,39, IC 95%=[0,22-0,66], $p < 0,001$). La mise en évidence de ces SNP nous a permis d'élaborer deux modèles pharmacogénétiques de prédiction de risque, un pour la réponse histologique et un pour la survie, modèles dont les performances en terme de calibration et de discrimination ont pu être évaluées et considérées comme satisfaisantes.

Concernant la toxicité, deux analyses ont été réalisées pour modéliser le risque de survenue de toxicité aiguë sévère, en considérant soit la survenue d'au moins un épisode toxique (modèle logistique) soit le nombre d'épisodes (modèle de Poisson). Par ces deux méthodes, 19 et 39 SNP respectivement ont été identifiés comme associés à la toxicité, dont 6 par les deux méthodes (rs13137622 et rs2622604 dans ABCG2, rs4149035 dans SLCO1B1 et rs2296147 dans ERCC5 pour la toxicité cutanée ; rs4148324 dans UGT1A et rs408626 dans DHFR pour l'augmentation de la bilirubine). Neuf gènes comportaient des SNP significativement associés à des toxicités différentes : ABCB1 était associé à la toxicité hépatique (ASAT/ALAT) et neurologique centrale, ABCG2 à la toxicité rénale, cutanée et hépatique (ASAT/ALAT et bilirubine), SLCO1B1 à la toxicité hématologique (neutropénie fébrile) et cutanée, UGT1A à

la toxicité muqueuse, hépatique (bilirubine) et hématologique (neutropénie fébrile), ABCC1 et DHFR à la toxicité hépatique (ASAT/ALAT) et cutanée et ITPA, MTHFR et MTRR à la toxicité hépatique ASAT/ALAT et bilirubine.

Jusqu'à présent peu d'études pharmacogénétiques ont été réalisées chez les patients atteints d'ostéosarcome traités par MTX à haute dose. L'analyse de la littérature nous a permis d'identifier 13 études pharmacogénétiques d'association à des critères d'efficacité ou de toxicité publiées (**Tableau 21**). Le nombre de patients inclus variait de 37 à 208, le nombre de SNP testés, de 1 à 346 (médiane = 6) et le nombre de gènes, de 1 à 31 (médiane = 5). Une analyse d'association avec des critères d'efficacité a été réalisée dans 11/13 études dont 7 avec un critère de réponse histologique et 11 avec un critère de survie, et avec des critères de toxicité dans 9/13 études. Comparativement aux données de la littérature, nos résultats ont permis de mettre en évidence des associations non identifiées et le plus souvent non explorées jusqu'à présent. En particulier, pour la réponse histologique, le modèle pharmacogénétique que nous avons élaboré incluait 3 SNP dans 3 gènes différents qui n'avaient jusqu'à présent été testés pour la réponse histologique que dans très peu d'études (2 pour DHFR, 1 pour CYP3A5 et 0 pour UGT1A), dont aucune n'avait mis en évidence d'association significative, mais avec un nombre de patients inclus <100 et en conséquence une puissance faible. Concernant la survie, les 4 SNP que nous avons retenus étaient situés dans 3 gènes (UGT1A, ABCB1 et ABCC3), dont deux avaient précédemment été testés (ABCB1 dans 5 études et ABCC3 dans 2 études) et retrouvés comme significativement associés à la survie dans deux études différentes^{115,128}. ABCB1 et ABCC3 codent pour des protéines transmembranaires agissant comme transporteurs permettant l'efflux des agents de chimiothérapies et leur excrétion biliaire et intestinale. En particulier ABCC3 est impliqué dans le transport du méthotrexate et a été précédemment retrouvé comme associé à des critères d'efficacité du traitement par méthotrexate dans des pathologies autres que l'ostéosarcome (leucémie aiguë myéloblastique et polyarthrite

rhumatoïde)^{129,130}. Ces différents éléments plaident en faveur d'un effet de ces transporteurs dans la modulation de la réponse au traitement par méthotrexate mais l'inconstance de ces résultats et l'identification de SNP différents selon les études n'entraînant pas de variation connue ni de la structure ni de la fonction de ces gènes rend difficile la translation de ces résultats en clinique. A ce jour, aucun de ces gènes n'est donc analysé en pratique clinique à visée pharmacogénétique.

Concernant les études de toxicité, l'analyse de la littérature a révélé l'identification de multiples gènes associés variablement à des critères de toxicité différents. Comparativement à notre étude, nous retrouvons notamment l'association de ABCB1 et MTHFR avec la toxicité hépatique du MTX. Ces résultats tendent à montrer que la toxicité du MTX est corrélée à des facteurs pharmacogénétiques, mais probablement multiples et expliquant chacun une faible variabilité de la toxicité observée d'où l'absence de réplication des résultats d'une étude à l'autre. De surcoût les modalités d'analyse de la toxicité sont très variables. Dans notre étude, nous avons testé deux méthodes différentes basées sur des modélisations différentes de la toxicité (survenue d'au moins une toxicité sévère vs. comptabilisation des toxicités sévères) et avons observé des résultats différents attestant de l'importance de la prise en compte de la modélisation de la toxicité dans l'analyse.

Tableau 21 : Résultats des analyses d'associations entre polymorphismes génétiques (SNP) et efficacité ou toxicité aiguë de la chimiothérapie par Méthotrexate haute dose précédemment rapportées dans les études pharmacogénétiques réalisées chez les patients atteints d'ostéosarcome.

Reference	Nb patients	Nb SNP	Nb genes	Genes	Pre-op CT	Histological response	Survival outcomes	Toxicity outcomes
Patño-García, 2009 ¹³¹	96	6	5	MTHFR, MTR, RFC1, SHMT1, TYMS	MAP	No significant association	No significant association	Hematological: MTHFR C677T (Rec; OR=3,95; 95%CI=1,14-13,7; p=0,023) Gastro-intestinal: MTR A2756G (Rec; p=0,048)
Windsor, 2012 ¹³²	50	34	22	MTHFR, MTHFD1, RFC, DHFR, TS, ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, ERCC1, ERCC2, ERCC4, XRCC3, XPC, GSTP1, GSTT1, GSTM1, CBR3, CCND1, NQO1, NADPH, CYBA	MAP	ABCC2 24C>T (Dom; OR=6,3; 95%CI=1,4-28,5; p=0,017), GSTP1 313A>G (Dom; OR=7,9; 95%CI=1,5-42,5; p=0,02), MTHFD1 1958G>A (Dom; OR=0,2; 95%CI=0,05-0,9; p=0,03)	PFS unadjusted: CCND1 870A>G (Dom; HR=0,26; 95%CI=0,08-0,9; p=0,028), GSTP1 313A>G (Dom; HR=4,8; 95%CI=1-22,4; p=0,04), RFC 80G>A (Dom; log rank p=0,02), GSTT1 (Null allele; HR=4,1; 95%CI=1,4-2,4; p=0,012) (Fig. 1)	Anemia: MTHFD1 1958G>A (Dom; OR=5,4; 95%CI=1-27,5; p=0,044), MTHFR 1298A>C (Dom; OR=4,6; 95%CI=1,1-19,2; p=0,038) Leucopenia: ABCC2 3563T>A (Dom; OR=5,2; 95%CI=1,2-22,4; p=0,028) Mucositis: ABCB1 3435T>C 6.2 (Dom; OR=6,2; 95%CI=1,2-31,8; p=0,027) Recurrent [any]: MTHFR 1298A>C (Dom; OR=4,8; 95%CI=1,3-17,1; p=0,015), ABCG2 421C>A (Dom; OR=0,1; 95%CI=0,01-1; p=0,05)

Caronia, 2011 ¹¹⁵	91	346	24	ABCA3, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCG2, ABCC6, SLC31A1, SLCO6A1, SLC19A1, MPO, SOD1, ALDH1A1, CYP3A4, 3A5, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2C9, GSTM1, GSTP1, GSTT1	MAP	No significant association	OS adjusted for meta: ABCC3 rs4148416 (Add; HR=7,25; 95%CI=2,62-20,1; p=0,00014), ABCB1 rs4148737 (Add; HR=2,83; 95%CI=1,56-5,12; p=0,00061), ABCB1 rs1128503 (Add; HR=0,27; 95%CI=0,13-0,54; p=0,00023), ABCB1 rs10276036 (Add; HR=0,27; 95%CI=0,13-0,54; p=0,00023)	NA
Yang, 2012 ¹³³	187	3	3	GSTP1, ERCC1, ERCC2	MAPI	NA	OS djusted for sex, age, subtype, location, metastasis, tumor size and anatomic location: ERCC2 Lys751Gln (AA vs.GG; HR=0,32; 95%CI=0,13-0,95; p<0,05)	NA
Yang, 2013 ¹²⁸	208	6	5	ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, ABCC3	MAP	ABCB1 rs1128503 (TT vs. CC; OR=2,46; 95%CI=1,21-5,74), ABCC3 rs4148416 (TT vs. CC; OR=3,78; 95%CI=1,20-13,85)	Unadjusted DFS and OS: ABCC3 rs4148416 (TT vs. CC; HR-DFS=4,32; 95%CI=1,753-15,65; HR-OS=3,46; 95%CI=1,15-10,43), ABCB1 rs1128503 (TT vs. CC; HR-DFS=3,74; 95%CI=1,63-7,40; HR-OS=2,25; 95%CI=1,15-4,80)	NA
Goricar, 2014 ¹³⁴	44	10	8	MTRR, MTR, SLC19A1, SLCO1B1, ABCC2, MTHFR, MTHFD1, ABCB1	MAP+/-I	No significant association	EFS: SLCO1B1 rs4149056 (Dom; HR= 0,26, 95%CI=0,07–0,94; p=0,04), rs11045879 (Dom; HR=0,20; 95%CI=0,05–0,89; p=0,034)	Renal and gastro-intestinal: no significant association Hemato: ABCC2 rs717620 (Dom; OR=0,20; 95%CI=0,04–0,91; p=0,038) Liver: ABCC2 rs717620 (Dom; OR=0,19; 95%CI=0,04–0,85; p=0,030)
Jabeen, 2015 ¹³⁵	62	8	7	RCF1, DHFR, DHFR, DHFR, MTHFR, MTHFR, ABCG2		NA	DFS: RCF1 rs1051266 (GG vs. AA; p=0,046)	Mucosits: DHFR rs1650723 (Add; p=0,005), ABCG2 rs2231135 Add; p=0,01) Liver: MTHFR 677 C>T (Add; p=0,007)
Park, 2016 ¹¹³	37	4	3	SLC19A1, MTHFR, ATIC		NA	NA	Mucositis: SLC19A1 80G>A (Rec; OR=0,06; 95%CI=0,005–0,693; p=0,026)

Hattinger, 2016 ¹³⁶	126 (efficacy), 57 (toxicity)	45	31	ABCB1, ABCC2, ABCG2, RFC, APE1, ERCC1, hMLH1, hMSH2, hOGG1, XPD, XPG, XRCC1, XRCC3, DHFR, FOLR1, GGH, MTHFD1, MTHFR, SHMT, TYMS, ATM, MDM2, p21, TP53, GSTT1, GSTM1, GSTP1, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4	MAPI	NA	Unadjusted EFS: ABCC2 rs2273697 (Dom; p=0,049), GGH rs11545078 (Rec; p=0,037), TP53 rs1642785 (Dom; p=0,01), CYP2B6*6 haplotype rs3745274 and rs2279343 (Rec; p=0,039)	Leucopenia: ABCC2 1249A/G (Dom; OR=13,16; 95%CI=1,56-111,12; p=0,018), MTHFR 1298A/C (Dom; OR=4,15; 95%CI=1,06-16,13; p=0,04) Nausea/vomiting: ABCC2 3972A/G (Dom-WT; OR=3,15; 95%CI=1,06-9,37; p=0,039) Liver: ABCB1 1236T/C (Dom; OR=2,21; 95%CI=1,22-4,00; p=0,001), ABCC2 1249A/G (Dom-WT; OR=2,48; 95%CI=1,47-4,18; p=0,001), GGH 16T/C (Dom-WT; OR=2,93; 95%CI=1,53-5,62; p=0,001)
Park, 2017 ¹³⁷	48	5	4	SLC19A1, DHFR, MTHFR, ATIC	MAP	ATIC rs2372536 (Dom; OR=0,13; 95%CI=0,02-0,98; p=0,048), MTHFR rs1801133 (Dom; OR=9,22; 95%CI=0,87-98,04; p=0,066)	No significant association	NA
Hegy, 2017 ¹³⁸	59	29	9	ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC10, ABCG2, GGH, SLC19A1, NR1I2	MAPI	NA	NA	Liver: NR1I2 rs3732361 (Dom; OR=0,1; 95%CI=0,01-0,7; p=0,014), rs3814058 (Dom; OR=0,3; 95%CI=0,1-0,7; p=0,007), rs6785049 (Dom; OR=0,1; 95%CI=0,01-0,7; p=0,02) Myelotoxicity: ABCC2 rs2273697 (OR=3,3; 95%CI=1,2-9,4; p=0,02), rs3740066 (OR=0,4; 95%CI=0,2-0,9; p=0,02), NR1I2 rs3732361 (OR=0,1; 95%CI=0,01-0,7; p=0,013), rs3814058 (OR=0,3; 95%CI=0,1-0,7; p=0,007), rs6785049 (OR=0,09; 95%CI=0,01-0,7; p=0,01)

Lambrecht, 2017 ¹³⁹	48	1	1	MTHFR	MAP	NA	RFS: MTHFR C677T (Rec; p=0,0355)	No significant association between MTHFR C677T and Mucositis, Neutropenia, Anemia, Thrombocytopenia and liver toxicity
Xu, 2018 ¹⁴⁰	109	2	1	MTHFR	MAP	No significant association	No significant association	Liver: MTHFR rs1801133 (T vs C; OR=1,98; 95%CI=1,15-3,41; p=0,01) Mucositis: MTHFR rs1801133 (T vs C; OR=2,06; 95%CI=1,06-4,0; p=0,04)

Pre-op CT : pre-operative chemotherapy. MAP: Methotrexate-Adriamycin-Cisplatin. MAPI: Methotrexate-Adriamycin-Cisplatin-Ifosfamide.

Comparativement aux études pharmacogénétiques précédemment publiées, notre analyse présente des points forts importants. Elle s'adosse à un essai clinique prospectif randomisé, permettant l'obtention de données cliniques de qualité pour les critères d'efficacité et de toxicité, prospectivement recueillies et déjà publiées. La stratégie thérapeutique utilisée était définie et homogène. L'échantillon de patients génotypé dans l'essai randomisé était représentatif de la population globale des patients inclus dans l'essai ayant reçu du MTX comme chimiothérapie initiale. Enfin, les résultats ont été validés par des méthodes d'échantillonnage (*bootstrap*) permettant à défaut d'échantillon de validation externe, de bénéficier d'une méthode de validation interne également utile pour la prise en compte des tests multiples.

Le point limitant principal est l'absence de validation externe. En conséquence, nous avons collecté les échantillons de sang de patients inclus dans l'essai clinique OS2006 mais non randomisés pour recevoir le zoledronate. Ces patients vont être génotypés pour les SNPs retenus comme significativement associés à l'efficacité des traitements et inclus dans les modèles pharmacogénétiques présentés ci-dessus. Cette population servira d'échantillon de validation externe pour les deux modèles pharmacogénétiques de prédiction de la réponse histologique et de la PFS. Nous ne pourrions par contre pas effectuer de validation externe des résultats de l'analyse d'association avec la toxicité faute de données de toxicité recueillies chez les patients non randomisés. Les résultats de cette analyse de validation sont attendus pour le début d'année 2020. La publication se fera sur la base de cette double population associant échantillon d'entraînement et échantillon de validation.

PARTIE 3 :

Effets des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie
sur le risque de survenue d'évènement tardifs toxiques

PARTIE 3 : Effets des traitements anti-cancéreux utilisés en pédiatrie sur le risque de survenue d'évènement tardifs toxiques, l'exemple de la toxicité auditive dans la cohorte FCCS

INTRODUCTION

Avec des taux de guérison supérieurs à 80%, les effets tardifs et la qualité de vie sont devenues des enjeux majeurs dans la prise en charge des cancers de l'enfant.¹⁴¹ En particulier, l'ototoxicité est un effet tardif bien connu, fréquent et invalidant, responsable de troubles d'apprentissage, d'isolement social et d'une altération de la qualité de vie des enfants comme des adultes.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Les sels de platine et la radiothérapie cérébrale sont des facteurs de risque bien identifiés.¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ Néanmoins la modélisation du risque d'ototoxicité à long terme en fonction de la dose d'irradiation à l'oreille interne n'a pas été étudiée à ce jour. De plus, les effets directs ou indirects d'autres agents chimiothérapeutiques sur le risque d'ototoxicité sévère restent discutés. Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une analyse des facteurs de risque d'ototoxicité sévère chez les survivants à très long terme de cancer pédiatrique inclus dans l'étude épidémiologique FCCSS (*French Childhood Cancer Survivor Study*).

PATIENTS ET METHODES

Population d'étude et données collectées

La cohorte FCCSS comprend 7.670 survivants à 5 ans traités pour un cancer solide ou un lymphome (leucémies exclues) avant l'âge de 20 ans de 01/1942 à 12/2000. Elle combine l'étude Euro2K, correspondant aux patients traités entre 1942 et 1985 dans 5 centres anti-cancéreux en France (Gustave Roussy à Villejuif, l'Institut Curie à Paris, l'Institut Jean Godinot à Reims, le centre Lacassagne à Nîmes et le centre Claudius Régaud à Toulouse), et son extension, correspondant aux patients traités entre 1986 et 2000 sur l'ensemble du territoire national (seuls les patients traités à Gustave Roussy et à l'Institut Curie sur cette période ont pour l'instant pu être inclus dans la FCCSS). L'étude FCCSS a été approuvée par le comité d'éthique national de l'INSERM et par la commission nationale informatique et liberté (CNIL). Un consentement éclairé à participer à la recherche a été obtenu pour chaque patient inclus conformément aux exigences nationales en matière d'éthique de la recherche.

Nous avons inclus dans cette analyse les patients de la FCCSS ayant des données d'ototoxicité à long terme disponibles. Ces données ont été collectées à partir des auto-questionnaires FCCSS complétés entre 01/2005 et 12/2016, des bases de données médico-économiques de l'assurance maladie (couverture 2006-2016) et, pour les patients traités à Gustave Roussy, des comptes-rendus médicaux informatisés des consultations de suivi (depuis 1990). Au total, 5.151/7.670 patients avaient des données d'ototoxicité à long terme disponibles et ont donc été inclus dans cette analyse (67% de la cohorte).

Les informations démographiques et les données concernant les caractéristiques de la tumeur et les traitements anti-cancéreux reçus, incluant les doses cumulées de chimiothérapie et les doses et champs de radiothérapie (RT), ont été extraites des dossiers médicaux. Les doses d'irradiation reçues par l'oreille interne ont été reconstituées pour chaque patient sur la base des

plans de traitement et de fantômes anthropomorphiques spécifiques à l'âge et au sexe représentant le patient en position de traitement, comme décrit précédemment.¹⁵⁰ La dose moyenne de RT à l'oreille interne (égale à la moyenne des doses reçues par les côtés droit et gauche) a été calculée pour chaque patient. L'estimation de la dose RT à l'oreille interne n'a pas pu être effectuée pour 300 patients dont les dossiers médicaux étaient incomplets (5,8%). A noter que tous ces patients ayant été traités avant 2000, aucun n'a reçu de protonthérapie ni de radiothérapie avec modulation d'intensité (IMRT).

Définition des cas

Nous avons défini l'ototoxicité sévère par une perte auditive importante, nécessitant un appareillage auditif. Par conséquent, ont été considérés comme cas : (i) les patients ayant déclaré dans les auto-questionnaires FCCSS avoir une perte auditive ayant nécessité la pose d'un appareillage, après validation de cette information par contact direct avec le patient, ses proches ou son médecin, (ii) les patients pour lesquels des codes faisant référence à la pose ou à l'entretien d'appareils auditifs étaient identifiés dans les bases de données médico-économique de l'assurance maladie, et (iii) les patients suivis en consultation à Gustave Roussy et pour lesquels était rapportée une perte auditive ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif. Les cas identifiés par auto-questionnaires mais non validés ont été considérés comme non atteints d'ototoxicité sévère.

Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées en prenant en considération le temps jusqu'à l'évènement. La date d'évènement a été définie comme la date de la première pose d'un appareil auditif. La date de fin de suivi a été définie comme la date la plus récente avec données d'ototoxicité disponibles parmi : la date de réponse à l'auto-questionnaire FCCSS, la dernière date de consultation de suivi à Gustave Roussy ou pour les patients suivis par l'assurance maladie, la date de fin de

couverture de la base de données de l'assurance maladie. La date de point ayant été fixé au 01.01.2017 (date de fin de couverture de la base de données de l'assurance maladie), les données ont été censurées à cette date. La durée médiane de suivi a été estimée à l'aide de la méthode de Schemper.⁸⁰

Dans une première étape, nous avons étudié l'association entre les variables cliniques correspondant aux caractéristiques des patients au diagnostic du cancer pédiatrique (sexe, âge au diagnostic en classes : 0-1 an, 2-4 ans, 5-9 ans et ≥ 10 ans, année de diagnostic en classes : <1971, 1971-1980, 1981-1990 et 1991-2000) et aux traitements oncologiques reçus (exposition à la chimiothérapie et à la radiothérapie, doses cumulées de chimiothérapie en classes et dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne en classes, ces expositions ayant été calculées jusqu'à la date d'évènement ou à la date de fin de suivi) et la survenue d'une ototoxicité sévère. Pour ce faire, nous avons estimé les fonctions de distribution cumulative ($1 - S(t)$) où la fonction de survie $S(t)$ est estimée par la méthode de Kaplan-Meier³⁴) avec comme unité de temps l'âge atteint, et utilisé le test du log-rank pour leurs comparaisons. Les intervalles de confiance à 95% (IC95%) ont été calculés par la méthode de Rothman³⁵.

Dans une seconde étape, nous avons réalisé une analyse multivariée à l'aide d'un modèle de Cox stratifié sur le sexe et le centre. Nous avons utilisé le sexe comme strate du fait de l'existence en population générale d'un effet sexe variable au cours du temps. Le modèle de base comportait les variables suivantes : l'âge au diagnostic du cancer pédiatrique (0-1 an, 2-4 ans, 5-9 ans et ≥ 10 ans), l'année de diagnostic (<1971, 1971-1980, 1981-1990 et 1991-2000) et l'indice de désavantage social (FDep09, en continu)¹⁵¹. L'indice FDep09 résume le niveau de désavantage social des populations domiciliées dans chaque îlot de 2000 habitants (les IRIS ou « Ilots Regroupés pour l'Information Statistique ») en se basant sur quatre variables : le revenu médian par ménage, le pourcentage de bacheliers dans la population de plus de 15 ans, le pourcentage d'ouvriers dans la population active et le taux de chômage. L'indice FDep09 choisi

correspondait à celui de la dernière adresse connue du patient. Les variables significatives en univarié au seuil 0.05 ont été introduites dans le modèle de base. Pour tenir compte des doses manquantes (classées dans la catégorie de dose =0), nous avons ajouté dans le modèle les covariables dose cumulée de carboplatine inconnue, dose cumulée de cisplatine inconnue et dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne inconnue.

Dans le modèle principal, les doses cumulées de carboplatine et de cisplatine ainsi que les doses de radiothérapie ont été analysées sous forme catégorielle, bien que ceci puisse constituer un facteur limitant, l'établissement des catégories de doses nécessitant la formulation d'une hypothèse forte sur la nature de la relation dose-effet. En conséquence nous avons exploré les autres modélisations possibles de la relation dose-effet pour ces expositions. Un écart à la log-linéarité a été recherché par l'analyse des résidus de Martingale. En cas d'écart à la log-linéarité, la forme de la relation dose-effet a ensuite été étudiée par un modèle de régression de Poisson ajusté sur le sexe, l'âge au diagnostic, l'année de diagnostic et la durée de suivi.

Pour mieux étudier l'effet des sels de platine (cisplatine et carboplatine), nous avons également étudié une combinaison des deux covariables binaires cisplatine et carboplatine, comme rapporté dans la littérature (covariable catégorielle en 4 classes : ni cisplatine ni carboplatine, cisplatine seul, carboplatine seul et exposition aux deux agents).

Afin de prendre en compte un potentiel facteur de confusion sur l'effet de la dose de RT à l'oreille interne lié au type de cancer (et en particulier au fait d'avoir été traité pour une tumeur cérébrale), nous avons réalisé des analyses de sensibilité : (i) en introduisant un ajustement supplémentaire sur le type de cancer pédiatrique, et (ii) en excluant les patients traités pour tumeurs cérébrales.

Afin de mieux comprendre les effets potentiels du melphalan et du busulfan, les caractéristiques des patients traités avec ces agents de chimiothérapie ont été rapportées. Cette analyse a conduit à explorer deux hypothèses :

- (i) l'effet melphalan observé n'est-il pas un effet indirect lié à un sur-risque d'ototoxicité auditive sévère chez les patients traités pour neuroblastome par cisplatine ? Cette hypothèse a été testée par l'introduction de la variable neuroblastome (oui/non) et d'un terme d'interaction entre les variables exposition au cisplatine et neuroblastome.
- (ii) le busulfan n'est-il pas responsable d'une potentialisation de l'effet de la radiothérapie sur l'oreille interne ? Pour explorer l'effet différentiel de la dose de RT à l'oreille interne en fonction de l'exposition au busulfan, l'interaction entre ces deux variables a été testée.

Tous les tests statistiques étaient bilatéraux, au seuil de significativité 0.05. Les analyses statistiques ont été effectuées avec R 3.0.2, SAS 9.4 et Epicure.

RÉSULTATS

Cette analyse a porté sur 5.151 patients, survivants à 5 ans de cancer pédiatrique (sex-ratio M/F=1,17, âge médian au diagnostic=5 ans, année médiane du diagnostic=1985). Les lymphomes (18%), les tumeurs de Wilms (16%), les neuroblastomes (14%) et les tumeurs cérébrales (13%) étaient les diagnostics les plus fréquents (**Tableau 22**). Le recul moyen était de 30 ans (minimum=9 ans, maximum=65 ans) et l'âge médian aux dernières nouvelles de 36 ans (15-77 ans).

Sur 272 cas potentiels d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareil auditif, 196 ont été validés. Les caractéristiques cliniques de ces patients sont détaillées dans le **Tableau 23**. D'importantes variations de probabilités cumulées d'ototoxicité sévère ont été observées selon le type de cancer pédiatrique : de 0,4% (0,2-1,2) avant l'âge de 30 ans pour les patients traités pour lymphome à 5,2% (3,8-7,2) pour ceux traités pour neuroblastome et 10,3% (8,1-12,9) pour ceux traités pour tumeur cérébrale (**Tableau 24**). L'âge médian à la pose du premier appareillage auditif était de 21 ans (4-67), mais variait considérablement selon le premier type de cancer, de 11 ans (4-29) chez les patients atteints de neuroblastome à 38 ans (18-67 ans) chez les patients atteints de sarcome osseux. La proportion de patients appareillés ayant reçu du cisplatine à une dose cumulée supérieure à 400 mg/m² était de 11%, mais atteignait 26% chez ceux traités pour neuroblastome. Presque tous les patients traités pour neuroblastome et portant un appareil auditif avaient reçu une chimiothérapie à haute dose, en particulier du melphalan (74%) ou du busulfan (46%).

Tableau 22 : Caractéristiques cliniques de l'ensemble des patients inclus dans l'analyse ototoxicité (avec ou sans ototoxicité sévère appareillée) en fonction du type de cancer pédiatrique.

	Wilms tumor No. (%)	Neuroblastoma No. (%)	Lymphoma No. (%)	Soft-tissue sarcoma No. (%)	Bone sarcoma No. (%)	Brain tumor No. (%)	Gonadal tumor No. (%)	Retinoblastoma No. (%)	Other No. (%)
Overall	844	704	912	580	476	647	318	351	319
Age at diagnosis (years)									
<i>Median (range)</i>	3 (0-18)	0 (0-20)	9 (0-19)	6 (0-20)	12 (0-20)	6 (0-19)	10 (0-18)	1 (0-14)	11 (0-19)
0–4 years	295 (35)	502 (71)	32 (4)	116 (20)	8 (2)	75 (12)	94 (30)	246 (70)	40 (13)
5–9 years	350 (41)	125 (18)	134 (15)	136 (23)	30 (6)	171 (26)	24 (8)	88 (25)	28 (9)
10–14 years	170 (20)	52 (7)	296 (32)	143 (25)	112 (24)	226 (35)	35 (11)	14 (4)	73 (23)
15–19 years	29 (3)	25 (4)	450 (49)	185 (32)	326 (68)	175 (27)	165 (52)	3 (1)	178 (56)
Decade of diagnosis									
<i>Median (range)</i>	1981 (1948-2000)	1984 (1955-2000)	1985 (1951-2000)	1985 (1953-2000)	1988 (1956-2000)	1988 (1955-2000)	1985 (1951-2000)	1991 (1952-2000)	1989 (1953-2000)
<1971	159 (19)	79 (11)	55 (6)	55 (9)	28 (6)	40 (6)	21 (7)	14 (4)	24 (8)
[1971-1981[	258 (31)	169 (24)	204 (22)	156 (27)	73 (15)	123 (19)	84 (26)	57 (16)	49 (15)
[1981-1991[	248 (29)	263 (37)	375 (41)	203 (35)	172 (36)	244 (38)	112 (35)	97 (28)	100 (31)
≥1991	179 (21)	193 (27)	278 (30)	166 (29)	203 (43)	240 (37)	101 (32)	183 (52)	146 (46)
Attained age at severe ototoxicity diagnosis or last follow-up									
<i>Median (range)</i>	37 (6-69)	33 (4-70)	39 (6-70)	38 (4-77)	39 (18-76)	34 (6-66)	38 (19-70)	27 (13-59)	36 (7-74)
5–19 years	22 (3)	46 (7)	3 (0)	18 (3)	2 (0)	45 (7)	2 (1)	37 (11)	6 (2)
20–29 years	208 (25)	231 (33)	103 (11)	94 (16)	62 (13)	167 (26)	40 (13)	177 (50)	62 (19)
30–39 years	251 (30)	239 (34)	381 (42)	201 (35)	182 (38)	246 (38)	139 (44)	92 (26)	132 (41)
≥ 40 years	363 (43)	188 (27)	425 (47)	267 (46)	230 (48)	189 (29)	137 (43)	45 (13)	119 (37)
Years from diagnosis at severe ototoxicity diagnosis or last follow-up									
<i>Median (range)</i>	33 (5-66)	30 (2-62)	29 (3-61)	30 (1-64)	27 (10-61)	27 (3-57)	30 (10-63)	25 (9-57)	26 (4-62)
5–9 years	4 (0)	20 (3)	1 (0)	6 (1)	0 (0)	21 (3)	0 (0)	1 (0)	5 (2)

10–19 years	68 (8)	61 (9)	101 (11)	62 (11)	84 (18)	120 (19)	42 (13)	77 (22)	66 (21)
20–29 years	257 (30)	257 (37)	368 (40)	213 (37)	201 (42)	269 (42)	115 (36)	153 (44)	126 (40)
30–39 years	260 (31)	223 (32)	324 (36)	173 (30)	124 (26)	176 (27)	107 (34)	91 (26)	77 (24)
≥ 40 years	255 (30)	143 (20)	118 (13)	126 (22)	67 (14)	61 (9)	54 (17)	29 (8)	45 (14)
Carboplatin									
<i>Median (range)</i>	0 (0-6635)	0 (0-8000)	0 (0-500)	0 (0-7433)	0 (0-5220)	0 (0-14041)	0 (0-5144)	0 (0-9774)	0 (0-8042)
0	803 (95)	595 (85)	911 (100)	484 (83)	465 (98)	470 (73)	272 (86)	224 (64)	299 (94)
]0-1500[mg/m ²	9 (1)	64 (9)	1 (0)	42 (7)	6 (1)	49 (8)	30 (9)	38 (11)	10 (3)
>= 1500 mg/m ²	32 (4)	45 (6)	0 (0)	54 (9)	5 (1)	128 (20)	16 (5)	89 (25)	10 (3)
Cisplatin									
<i>Median (range)</i>	0 (0-400)	0 (0-1987)	0 (0-581)	0 (0-848)	0 (0-786)	0 (0-800)	0 (0-1500)	0 (0-586)	0 (0-1500)
0	842 (100)	592 (84)	908 (100)	547 (94)	379 (80)	488 (75)	207 (65)	334 (95)	240 (75)
]0-400[mg/m ²	2 (0)	74 (11)	2 (0)	17 (3)	31 (7)	134 (21)	59 (19)	14 (4)	37 (12)
> 400 mg/m ²	0 (0)	38 (5)	2 (0)	16 (3)	66 (14)	25 (4)	52 (16)	3 (1)	42 (13)
Busulfan	0 (0)	63 (9)	7 (1)	1 (0)	28 (6)	28 (4)	0 (0)	1 (0)	3 (1)
Melphalan	17 (2)	92 (13)	36 (4)	8 (1)	34 (7)	8 (1)	1 (0)	1 (0)	2 (1)
Dose at inner ear									
<i>Median (range)</i>	0 (0-42)	0 (0-52)	0 (0-52)	0 (0-52)	0 (0-96)	35 (0-82)	0 (0-45)	0 (0-55)	0 (0-113)
0	373 (44)	487 (69)	441 (48)	311 (54)	293 (62)	122 (19)	242 (76)	207 (59)	221 (69)
]0-1[Gy	459 (54)	174 (25)	145 (16)	144 (25)	153 (32)	10 (2)	46 (15)	43 (12)	30 (9)
[1-5[Gy	10 (1)	14 (2)	158 (17)	32 (6)	16 (34)	38 (6)	4 (1)	47 (13)	11 (3)
[5-20[Gy	0 (0)	18 (3)	70 (8)	50 (9)	7 (1)	73 (11)	4 (1)	42 (12)	18 (6)
[20-40[Gy	1 (0)	4 (1)	97 (11)	33 (6)	3 (1)	142 (22)	16 (5)	11 (3)	21 (7)
>= 40 Gy	1 (0)	7 (1)	1 (0)	10 (2)	4 (1)	262 (40)	6 (2)	1 (0)	1 (6)

Tableau 23 : Caractéristiques cliniques des patients ayant développé une ototoxicité sévère et porteur d'appareillage auditif en fonction du type de cancer pédiatrique.

	Wilms tumor No. (%)	Neuroblastoma No. (%)	Lymphoma No. (%)	Soft-tissue sarcoma No. (%)	Bone sarcoma No. (%)	Brain tumor No. (%)	Gonadal tumor No. (%)	Retinoblastoma No. (%)	Other No. (%)
Overall	13	35	6	14	9	95	9	2	13
Age at diagnosis (years)									
<i>Median (range)</i>	2 (0-9)	1 (0-11)	5.5 (0-13)	4.5 (1-15)	12 (6-17)	6 (0-18)	9 (0-17)	2 (1-3)	9 (0-17)
0–4 years	6 (46)	19 (54)	1 (17)	2 (14)	0 (0)	9 (9)	1 (11)	1 (50)	2 (15)
5–9 years	4 (31)	12 (34)	1 (17)	5 (36)	0 (0)	24 (25)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
10–14 years	3 (23)	3 (9)	2 (33)	5 (36)	3 (33)	38 (40)	5 (56)	0 (0)	7 (54)
15–19 years	0 (0)	1 (3)	2 (33)	2 (14)	6 (67)	24 (25)	3 (33)	0 (0)	4 (31)
Decade of diagnosis									
<i>Median (range)</i>	1979 (1953-1995)	1991 (1960-2000)	1976 (1961-1985)	1985 (1966-1994)	1981 (1958-1994)	1984 (1955-2000)	1983 (1963-1987)	1992 (1989-1996)	1985 (1970-1999)
<1971	4 (31)	1 (3)	1 (17)	1 (7)	1 (11)	6 (6)	1 (11)	0 (0)	1 (8)
[1971-1981[	3 (23)	5 (14)	3 (50)	3 (21)	3 (33)	30 (32)	3 (33)	0 (0)	3 (23)
[1981-1991[	5 (38)	10 (29)	2 (33)	5 (36)	4 (44)	35 (37)	5 (56)	1 (50)	6 (46)
≥1991	1 (8)	19 (54)	0 (0)	5 (36)	1 (11)	24 (25)	0 (0)	1 (50)	3 (23)
Attained age at severe ototoxicity diagnosis									
<i>Median (range)</i>	26 (6-65)	11 (4-29)	25 (6-45)	19 (4-46)	38 (18-67)	23 (6-61)	37 (29-67)	14 (13-14)	22 (7-51)
5–19 years	5 (38)	29 (83)	2 (33)	7 (50)	2 (22)	34 (36)	0 (0)	2 (100)	3 (23)
20–29 years	3 (23)	6 (17)	2 (33)	5 (36)	1 (11)	29 (31)	1 (11)	0 (0)	5 (38)
30–39 years	2 (15)	0 (0)	1 (17)	1 (7)	2 (22)	21 (22)	5 (56)	0 (0)	4 (31)
≥40 years	3 (23)	0 (0)	1 (17)	1 (7)	4 (44)	11 (12)	3 (33)	0 (0)	1 (8)
Years from diagnosis at severe ototoxicity diagnosis									
<i>Median (range)</i>	25 (5-60)	8 (2-27)	18 (3-38)	11 (1-43)	22 (10-57)	16 (3-47)	27 (22-53)	11 (9-13)	12 (4-42)
5–9 years	4 (31)	20 (57)	1 (17)	6 (43)	0 (0)	21 (22)	0 (0)	1 (50)	5 (38)

10–19 years	2 (15)	11 (31)	3 (50)	4 (29)	3 (33)	39 (41)	0 (0)	1 (50)	4 (31)
20–29 years	4 (31)	4 (11)	1 (17)	3 (21)	2 (22)	23 (24)	5 (56)	0 (0)	3 (23)
30–39 years	1 (8)	0 (0)	1 (17)	0 (0)	3 (33)	9 (9)	3 (33)	0 (0)	0 (0)
≥40 years	2 (15)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (11)	3 (3)	1 (11)	0 (0)	1 (8)
Carboplatin									
<i>Median (range)</i>	0 (0-4064)	0 (0-2984)	0 (0-0)	0 (0-3539)	0 (0-0)	0 (0-7714)	0 (0-0)	1350 (0-2700)	0 (0-0)
0	11 (84)	19 (54)	6 (100)	10 (71)	9 (100)	70 (74)	9 (100)	1 (50)	13 (100)
]0-1500[mg/m ²	1 (8)	9 (26)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	11 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
≥1500 mg/m ²	1 (8)	7 (20)	0 (0)	3 (21)	0 (0)	14 (15)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
Cisplatin									
<i>Median (range)</i>	0 (0-265)	390 (0-884)	0 (0-0)	0 (0-200)	0 (0-609)	0 (0-600)	0 (0-509)	0 (0-0)	0 (248-613)
0	12 (92)	8 (23)	6 (100)	13 (93)	6 (67)	76 (80)	5 (56)	2 (100)	6 (46)
]0-400[mg/m ²	1 (8)	18 (51)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	15 (16)	1 (11)	0 (0)	4 (31)
> 400 mg/m ²	0 (0)	9 (26)	0 (0)	0 (0)	3 (33)	4 (4)	3 (33)	0 (0)	3 (23)
Busulfan	0 (0)	16 (46)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Melphalan	1 (8)	26 (74)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Dose at the inner ear									
<i>Median (range)</i>	0 (0-1)	0 (0-52)	1 (0-23)	0 (0-46)	0 (0-55)	44 (0-76)	0 (0-45)	4 (0-8)	20 (0-80)
0	2 (15)	18 (51)	2 (33)	4 (29)	4 (44)	4 (4)	5 (56)	0 (0)	2 (15)
]0-1[Gy	11 (85)	13 (37)	1 (17)	4 (29)	4 (44)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (15)
[1-5[Gy	0 (0)	0 (0)	1 (17)	2 (14)	0 (0)	2 (2)	1 (11)	0 (0)	1 (8)
[5-20[Gy	0 (0)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (11)	0 (0)	1 (50)	1 (8)
[20-40[Gy	0 (0)	0 (0)	2 (33)	2 (14)	0 (0)	20 (21)	2 (22)	0 (0)	4 (31)
≥40 Gy	0 (0)	2 (5.71)	0 (0)	2 (14)	1 (11)	59 (62)	1 (11)	0 (0)	3 (23)

Tableau 24 : Résultats de l'analyse univariée avec présentation des probabilités cumulées de survenue d'une ototoxicité sévère nécessitant le port d'appareillage auditif avant l'âge de 30 et de 50 ans pour différentes caractéristiques cliniques et thérapeutiques (comparaison par test du log-rank).

Patients' Characteristics		n/N	Cumulative probability of severe ototoxicity (95%CI)		P value (log rank test)
			at 30 years	at 50 years	
Gender	Men	100 / 2777	2.7% (2.2%-3.4%)	5.2% (4.1%-6.8%)	0.4452
	Women	96 / 2374	2.8% (2.2%-3.6%)	5.6% (4.5%-7.1%)	.
Age at diagnosis	<2 years	41 / 1408	2.9% (2.1%-4%)	4% (2.6%-6.2%)	<.0001
	[2-5[years	47 / 1086	3.8% (2.8%-5.2%)	5.5% (3.9%-7.8%)	.
	[5-10[years	66 / 1121	3.8% (2.8%-5.1%)	8.2% (6.2%-10.8%)	.
	≥10 years	42 / 1536	1.1% (0.6%-1.7%)	3.8% (2.6%-5.5%)	.
Decade of diagnosis	<1971	16 / 475	0.8% (0.3%-2.2%)	2.4% (1.3%-4.3%)	0.0105
	[1971-1981[	53 / 1173	2.5% (1.7%-3.5%)	5.4% (4.1%-7.3%)	.
	[1981-1991[	73 / 1814	3.1% (2.4%-4.1%)	8.3% (4.4%-15.4%)	.
	≥1991	54 / 1689	2.9% (2.2%-3.8%)	.	.
Type of cancer	Wilms' tumor	13 / 844	1% (0.5%-2%)	2.3% (1.1%-4.5%)	<.0001
	Neuroblastoma	35 / 704	5.2% (3.8%-7.2%)	5.2% (3.8%-7.2%)	.
	Lymphoma	6 / 912	0.4% (0.2%-1.2%)	1% (0.4%-2.5%)	.
	Soft-tissue sarcoma	14 / 580	2.1% (1.2%-3.7%)	3.2% (1.7%-5.9%)	.
	Bone sarcoma	9 / 476	0.6% (0.2%-2%)	3.2% (1.3%-8.2%)	.
	Brain tumor	95 / 647	10.3% (8.1%-13%)	23% (18.1%-28.9%)	.
	Gonadal tumor	9 / 318	0.4% (0.1%-2.5%)	4.6% (2.2%-9.5%)	.
	Retinoblastoma	2 / 351	0.6% (0.1%-2.3%)	0.6% (0.1%-2.3%)	.
	Other	13 / 319	2.6% (1.3%-5.1%)	4.3% (2.4%-7.5%)	.
Radiotherapy	No	31 / 2422	1% (0.6%-1.5%)	2.5% (1.3%-4.8%)	<.0001
	Yes	165 / 2729	4.3% (3.6%-5.1%)	7.5% (6.4%-8.9%)	.
Chemotherapy	No	55 / 1272	2.7% (1.9%-3.7%)	5.6% (4.2%-7.5%)	0.7987
	Yes	141 / 3879	2.8% (2.3%-3.4%)	5.4% (4.3%-6.7%)	.
Treatment	not RT and not CT	3 / 593	0.2% (0%-1.2%)	0.7% (0.1%-3.2%)	<.0001
	RT and not CT	50 / 630	4.7% (3.3%-6.7%)	9.2% (6.9%-12.2%)	.
	CT and not RT	27 / 1789	1.2% (0.8%-1.8%)	3.4% (1.5%-7.9%)	.
	RT and CT	116 / 2139	4.1% (3.4%-5.1%)	6.9% (5.6%-8.5%)	.
Anthracycline	No	136 / 3140	2.9% (2.4%-3.6%)	6% (5%-7.3%)	0.0667
	Yes	60 / 2011	2.5% (1.9%-3.3%)	4.6% (2.9%-7.3%)	.
Alkylating agents	No	74 / 2259	2% (1.5%-2.7%)	4.6% (3.5%-5.9%)	0.0119
	Yes	122 / 2892	3.4% (2.7%-4.1%)	6.2% (4.9%-7.9%)	.
Vinca alkaloids	No	91 / 2057	2.8% (2.1%-3.6%)	6% (4.7%-7.5%)	0.2827
	Yes	105 / 3094	2.8% (2.2%-3.4%)	5% (3.9%-6.3%)	.
Carboplatin	No	147 / 4512	2.1% (1.7%-2.6%)	4.6% (3.8%-5.6%)	<.0001
	Yes*	49 / 639	7.4% (5.5%-9.9%)	16.2% (9%-27.9%)	.

Patients' Characteristics		n/N	Cumulative probability of severe ototoxicity (95%CI)		P value (log rank test)
			at 30 years	at 50 years	
Carboplatin	0	148 / 4523	2.1% (1.7%-2.6%)	4.6% (3.8%-5.7%)	<.0001
	]0-1500[mg/m ²	22 / 249	7.4% (4.7%-11.6%)		.
	≥1500 mg/m ²	26 / 379	7.4% (4.9%-11.1%)		.
Cisplatin	No	133 / 4525	1.9% (1.5%-2.4%)	4.3% (3.5%-5.3%)	<.0001
	Yes**	63 / 626	8.9% (6.9%-11.5%)	20.3% (9.6%-40.1%)	.
Cisplatin	0	134 / 4537	1.9% (1.5%-2.4%)	4.3% (3.5%-5.3%)	<.0001
	]0-400[mg/m ²	40 / 370	10.3% (7.6%-14%)	12.1% (8.9%-16.3%)	.
	>400 mg/m ²	22 / 244	7.2% (4.5%-11.4%)	22.3% (8.7%-50.2%)	.
Busulfan	No	167 / 5020	2.3% (1.9%-2.7%)	4.9% (4.1%-5.9%)	<.0001
	Yes	29 / 131	22.2% (15.8%-30.8%)		.
Melphalan	No	167 / 4952	2.3% (1.9%-2.8%)	5% (4.1%-6%)	<.0001
	Yes	29 / 199	14.3% (10.1%-20.1%)	14.3% (10.1%-20.1%)	.
Mean dose at inner ear	0	41 / 2697	1.2% (0.9%-1.8%)	2.6% (1.5%-4.4%)	<.0001
	]0-1[Gy	36 / 1204	1.2% (0.5%-3.1%)	2.9% (1.3%-6.2%)	.
	[1-5[Gy	7 / 330	2% (1.4%-2.8%)	3.4% (2.4%-4.7%)	.
	[5-20[Gy	14 / 282	3.7% (2.0%-6.6%)	6.6% (3.3%-12.7%)	.
	[20-40[Gy	30 / 328	6.2% (4.1%-9.4%)	11.4% (7.9%-16.2%)	.
	≥40 Gy	68 / 310	14.7% (11.1%-19.2%)	31% (23.6%-40.1%)	.

ASCT: Greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques.

*Ont été classés dans cette catégorie les 11/639 patients (1.7%) pour lesquels la dose cumulée de carboplatine n'était pas connue.

*Ont été classés dans cette catégorie les 12/626 patients (1.9%) pour lesquels la dose cumulée de cisplatine n'était pas connue.

En analyse univariée, l'âge au diagnostic, la période de diagnostic, le cisplatine, le carboplatine, le busulfan, le melphalan, les agents alkylants et la dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne étaient significativement associés à la pose d'un appareillage auditif (**Tableau 24**).

En analyse multivariée (**Tableau 25**), le risque d'ototoxicité sévère nécessitant un appareillage auditif augmentait de manière significative avec la dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne, avec un HR variant de 1,7 (IC95%=1,1-2,8) pour des doses < 1 Gy, à 14,8 (IC95%=9,7-22,6) pour des doses $\geq$ 40 Gy. La dose cumulée de cisplatine ($p < 0,0001$) ainsi que l'exposition au busulfan ($p < 0,0001$) ou au melphalan ($P = 0,0002$) étaient également significativement associées à la pose d'un appareillage auditif, alors que la dose cumulée de carboplatine ne l'était pas ($p = 0,42$).

Nous avons exploré les autres modélisations possibles de la relation dose-effet pour la dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne et pour les doses cumulées de carboplatine et de cisplatine. Pour ce faire, un écart à la log-linéarité a été recherché par l'analyse des résidus de Martingale (**Figure 25**). Un écart significatif à la log-linéarité a été observé pour chacune de ces variables ($p < 0,0001$, $p = 0,01$ et $p = 0,008$, respectivement).

Nous avons poursuivi l'exploration de la modélisation de la relation dose-effet pour la dose moyenne d'irradiation à l'oreille interne par des modèles de régression de Poisson dont les résultats sont présentés dans le **Tableau 26**. Le meilleur modèle de la relation dose-effet était le modèle quadratique (déviante la plus faible parmi les trois modèles à un paramètre : linéaire, exponentiel et quadratique), avec un excès de risque relatif (ERR) à 1 Gray estimé à 0,0074 (IC95%=0,0047-0,011) ne variant pas avec l'âge atteint ($p > 0,5$). L'ajout d'un terme exponentiel ou quadratique au modèle linéaire n'améliorait pas de façon significative l'estimation de la relation dose-effet comparativement au modèle quadratique (déviante non significativement

différente). L'estimation de la relation dose-effet avec le modèle quadratique est représentée sur la **Figure 26**.

Concernant la forme fonctionnelle des doses cumulées de carboplatine et de cisplatine, l'examen des résidus de Martingale confirmait que le découpage catégoriel utilisé dans le modèle principal (carboplatine < vs. ≥ 1500 mg/m² et cisplatine < vs. ≥ 400 mg/m²) prenait bien en considération l'écart à la log-linéarité par paliers de doses. En complément, nous avons étudié l'effet cumulé carboplatine-cisplatine en remplaçant les deux covariables binaires carboplatine et cisplatine par une seule variable catégorielle en 4 classes (ni cisplatine ni carboplatine, cisplatine seul, carboplatine seul, exposition aux deux agents). Les résultats étaient similaires, sans effet significatif du carboplatine (HR=1,5, IC95%=0,8-2,6) et sans majoration de l'effet du cisplatine en cas de combinaison au carboplatine (HR=3,3, IC95%=2,1-5,1 pour cisplatine seul et HR=2,9, IC95%=1,7-5,0 pour cisplatine + carboplatine).

Tableau 25 : Résultats de l'analyse multivariée sur le risque d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif dans la FCCSS.

Clinical characteristics	HR	95%CI	P value
Age at diagnosis (years)			0.057
[0-2[	Ref		
[2-5[	1.01	(0.65- 1.56)	
[5-10[	1.36	(0.89- 2.08)	
≥10	0.80	(0.50- 1.27)	
Year of diagnosis			0.42
<1971	Ref		
[1971-1981[	1.18	(0.66- 2.13)	
[1981-1991[	1.02	(0.55- 1.87)	
≥1991	0.77	(0.38- 1.55)	
Dose at the inner ear (Gy)			<0.0001
0	Ref		
]0-1[	1.74	(1.09- 2.77)	
[1-5[	1.75	(0.77- 3.96)	
[5-20[	3.38	(1.81- 6.29)	
[20-40[	6.32	(3.81- 10.46)	
≥40	14.77	(9.67- 22.56)	
Carboplatin			0.42
0*	Ref		
]0-1500] mg/m ²	1.39	(0.79- 2.45)	
>1500 mg/m ²	0.99	(0.58- 1.68)	
Cisplatin			<0.0001
0**	Ref		
]0-400] mg/m ²	2.37	(1.54- 3.65)	
>400 mg/m ²	3.69	(2.27- 5.99)	
Busulfan	3.09	(1.78- 5.37)	<0.0001
Melphalan	2.66	(1.58- 4.45)	0.0002
Fdep09	0.99	(0.58- 1.68)	0.15
AIC	2532.075		
C-index de Uno	0.827		

Fdep09: Indice de défavorisation sociale. HR: Hazard ratio. 95%CI: intervalle de confiance à 95%.

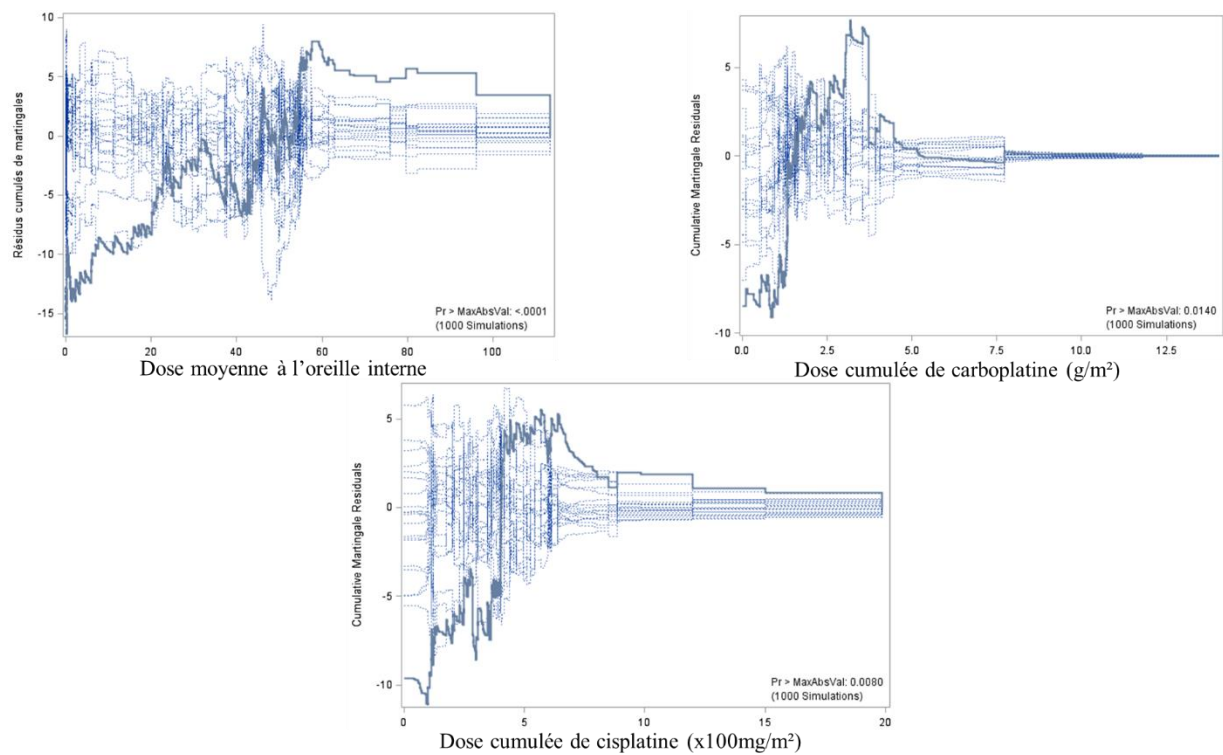


Figure 25 : Etude de la forme fonctionnelle des variables continues dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne et doses cumulées de carboplatine et de cisplatine avec recherche d'un écart à log-linéarité par analyse des résidus de Martingale.

Tableau 26 : Modèles et coefficients estimés pour la relation dose-effet entre la dose moyenne d'irradiation à l'oreille interne et le risque d'ototoxicité sévère.

L'analyse a été limitée aux patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie associée à l'ototoxicité (cisplatine, carboplatine, melphalan, busulfan). Les modèles ont été ajustés sur le sexe, l'âge au diagnostic, l'année de diagnostic et la durée de suivi.

Models	Parameter estimates (95%CI.)			Deviance
	Dose	Exp (Dose)	Dose ²	
Basic: $OR = \exp(\alpha_1 CV)$				2034.2
Linear: $OR = [\exp(\alpha_1 + \alpha_1 CV)][1 + \beta_1 dose]$	0.32 (0.20 ; 0.52)			1879.5
Exponential: $OR = \exp(\alpha_1 CT)[1 + \exp(\beta_2 dose)]$		0.070 (0.062 ; 0.079)		1880.4
Quadratic: $OR = \exp(\alpha_1 CT)[1 + \beta_3 dose^2]$			0.0073 (0.0041 ; 0.011)	1875.6
Linear-exponential: $OR = \exp(\alpha_1 CT) [1 + \beta_1 dose + \exp(\beta_2 dose)]$	0.0078 (0.0023 ; 0.022)	-0.0015 (-0.024 ; 0.023)		1875.6
Linear-quadratic: $OR = \exp(\alpha_1 CT) [1 + \beta_1 dose + \beta_3 dose^2]$	0.089 (-0.065 ; 0.33)		0.0056 (0.00075 ; 0.011)	1874.6

95%CI.: intervalle de confiance à 95%; OR: odd ratio; CV: covariables ; NE: non estimable.

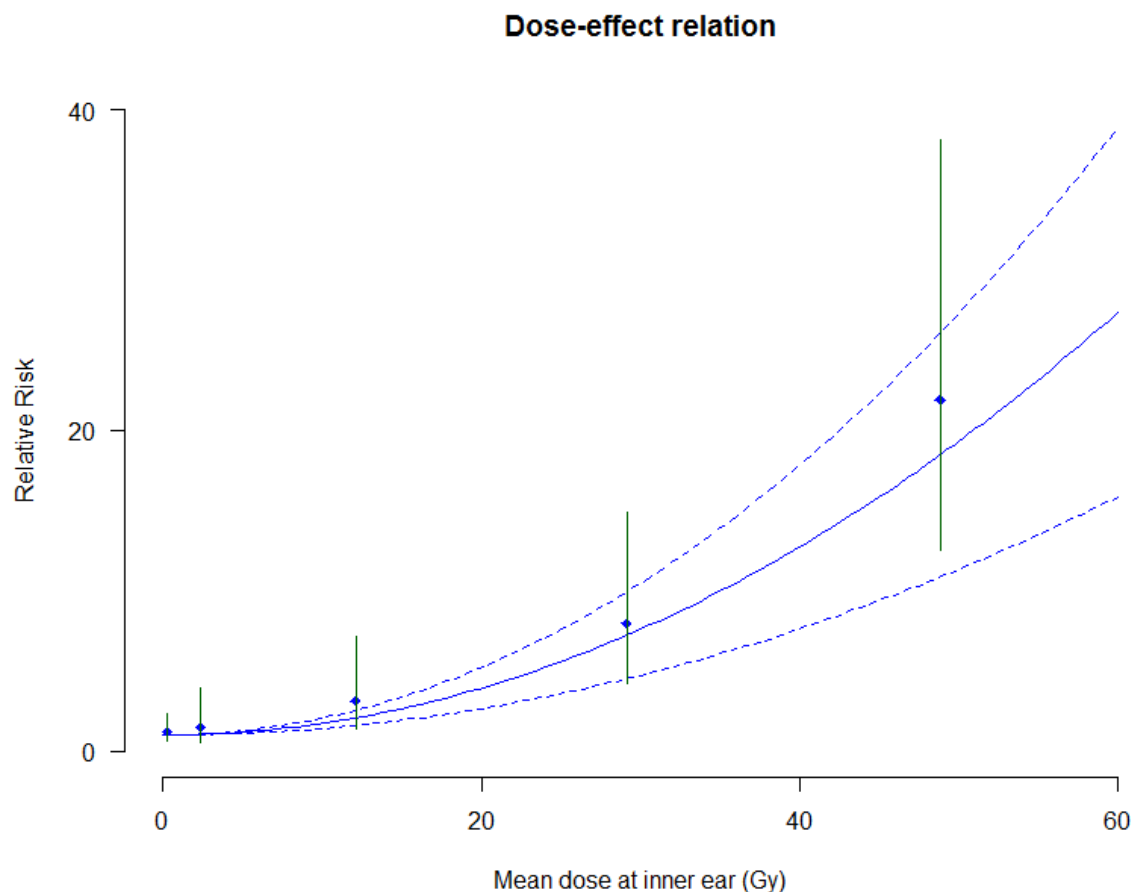


Figure 26 : Représentation de la relation dose-effet entre la dose moyenne de radiothérapie à l’oreille interne et le risque d’ototoxicité sévère.

Les différents points correspondent aux risques relatifs calculés pour différentes catégories de doses. La courbe du milieu correspond à la relation estimée entre la dose moyenne de radiothérapie à l’oreille interne et le risque de survenue d’une ototoxicité sévère nécessitant un appareillage à l’aide d’un modèle quadratique. Les courbes supérieures et inférieures correspondent aux intervalles de confiance à 95% de la relation estimée.

En analyses de sensibilité, nous avons exploré l'effet de la dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne sur le risque d'ototoxicité, en particulier pour les faibles doses (<5 Gy), en complétant les analyses par (i) un ajustement supplémentaire sur le type de cancer pédiatrique et (ii) après exclusion des patients traités pour une tumeur cérébrale. Dans les deux cas, les résultats étaient très similaires avec des HR pour des doses d'irradiation à l'oreille moyenne <1 Gy et de 1 à 5 Gy de 1,9 (IC95%=1,2-3,1) et 2,2 (IC95%=0,9-5,1) après ajustement sur le type de cancer pédiatrique, et de 2,1 (IC95%=1,3-3,4) et 2,0 (IC95%=0,8-5,2) après exclusion des patients traités pour une tumeur cérébrale.

Enfin, afin de mieux explorer l'impact du melphalan et du busulfan, les caractéristiques des patients ayant reçu ces médicaments ont été étudiées. Parmi les 199 patients traités par melphalan, 92 avaient été traités pour un neuroblastome (46%), 36 pour un lymphome (18%), 34 pour un sarcome osseux (17%), 17 pour un néphroblastome (9%) et 20 pour d'autres types de tumeurs solides (10%). Quatre-vingt-cinq avaient reçu du cisplatine (43%), dont une majorité des patients traités pour neuroblastome ($n=74/92$, 80%, vs. $1/36$ lymphome, $1/34$ sarcome osseux, $1/17$ néphroblastome et $8/20$ autres). La dose de cisplatine administrée par cycle était de 200 mg/m^2 pour $52/74$ patients traités pour neuroblastome (70%, dose unitaire non disponible pour 15 cas) contre $\leq 120\text{ mg/m}^2$ dans les autres pathologies. La pose d'un appareillage auditif a été observée chez $29/199$ patients traités par melphalan, dont $26/92$ traités pour neuroblastome, $0/36$ pour un lymphome, $1/34$ pour un sarcome osseux, $1/17$ pour un néphroblastome et $1/20$ pour une autre tumeur solide. Les 26 patients appareillés traités pour neuroblastome avaient tous reçu une chimiothérapie comportant du cisplatine, contrairement aux 3 autres patients appareillés qui n'avaient pas reçu de cisplatine. La dose de cisplatine administrée par cycle était de 200 mg/m^2 pour $18/26$ (69%, dose unitaire non disponible pour 5 cas). Au total, la probabilité cumulée d'appareillage auditif à l'âge de 30 ans chez les patients traités par melphalan était de 36,4% (IC95%=25,9-48,4) pour ceux traités pour neuroblastome

(NBL+) et ayant reçu du cisplatine (CDDP+) contre 0% pour ceux NBL+ CDDP-, 0% pour ceux NBL- CDDP+ et 2,1% (IC95%=0,6-7,3) pour ceux NBL- CDDP- ($p<0,0001$). Dans le modèle principal, l'ajout de la covariable neuroblastome (oui/non) et d'un terme d'interaction entre cisplatine et neuroblastome entraînait une disparition de l'effet significatif du melphalan (HR=1,3, IC95%=0,6-2,5, $p=0,50$) tandis que l'interaction entre cisplatine et neuroblastome était significative ($p<0,0001$). Le risque d'ototoxicité sévère nécessitant un appareillage était multiplié par 1,8 (IC95%=1,1-2,8) en cas de traitement par cisplatine comparativement à l'absence de traitement par cisplatine chez les patients traités pour une pathologie autre que le neuroblastome, et par 8,6 (IC95%=4,4-16,7) chez les patients traités pour neuroblastome.

Parmi les 131 patients traités par busulfan, 63 avaient été traités pour un neuroblastome (48%), 28 pour une tumeur cérébrale (21%), 28 pour un sarcome osseux (21%) et 12 pour une autre tumeur solide (9%). Soixante-douze avaient reçu du cisplatine ($n=72/131$, 55%) dont une majorité des patients traités pour neuroblastome ($n=52/63$, 83%) ou une tumeur cérébrale ($n=16/28$, 57%) contre 1/28 sarcome osseux et 3/12 autres. La dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne était ≥ 5 Gy chez 1/63 patient traité pour un neuroblastome (2%), 26/28 pour une tumeur cérébrale (93%), 2/28 pour un sarcome osseux (7%) et 2/12 pour une autre tumeur solide (17%). La pose d'un appareillage auditif a été observée chez 29/131 patients traités par busulfan, dont 16/63 pour un neuroblastome (25%), 13/28 pour une tumeur cérébrale (46%), 0/28 pour un sarcome osseux et 0/12 pour une autre tumeur solide. Parmi ces 29 patients, 21 avaient reçu du cisplatine (72%), dont 16/16 pour un neuroblastome (100%) et 5/13 pour une tumeur cérébrale (38%). La dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne était ≥ 5 Gy chez 0/16 patient traité pour un neuroblastome et 12/13 pour une tumeur cérébrale (92%). L'incidence cumulée d'appareillage auditif à l'âge de 30 ans chez les patients traités par busulfan était de 25,9% (IC95%=16,3-38,4) pour ceux traités pour un neuroblastome, 41,2% (IC95%=23,4-62,5) pour ceux ayant reçu une dose moyenne de radiothérapie à l'oreille interne

≥ 5 Gy (hors neuroblastome) et 0% pour ceux ayant reçu une dose < 5 Gy (hors neuroblastome). Les probabilités cumulées en fonction du traitement par busulfan et de la dose de radiothérapie à l'oreille interne sont représentées sur la **Figure 27**. Le risque d'ototoxicité sévère nécessitant un appareillage était multiplié par 3,9 (IC95%=1,8-5,6) en cas de traitement par busulfan comparativement à l'absence de traitement par busulfan chez les patients ayant reçu une dose moyenne à l'oreille interne < 5 Gy, et par 17,7 (IC95%=8,8-35,6) chez ceux ayant reçu une dose ≥ 5 Gy. Cependant l'interaction entre busulfan et dose de radiothérapie à l'oreille interne n'était pas significative ($p=0,22$).

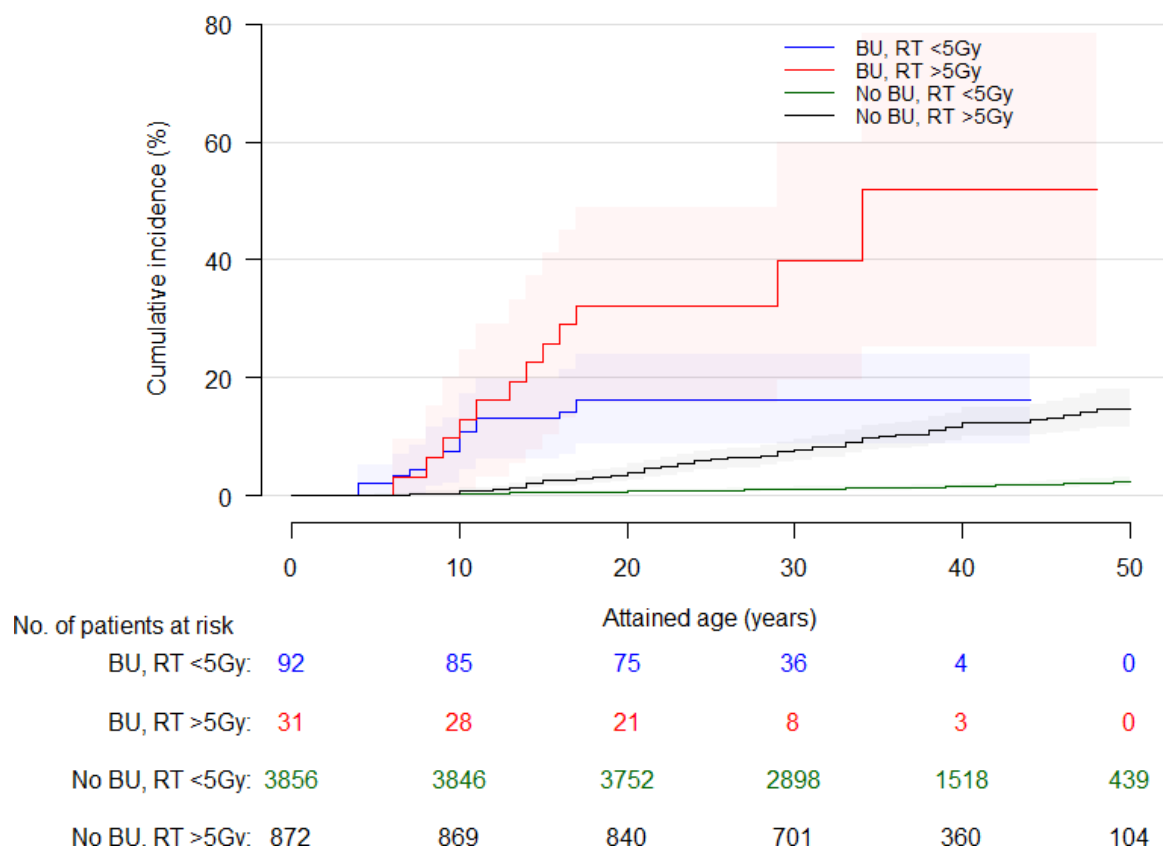


Figure 27 : Courbes de probabilités cumulées d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif dans la FCCSS en fonction de l'exposition au busulfan et de la dose de RT à l'oreille interne.

DISCUSSION

Le but de cette étude était d'analyser les facteurs de risque d'ototoxicité sévère liés à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans une cohorte de 5.151 survivants à 5 ans de cancer pédiatrique, en utilisant des données cliniques, épidémiologiques et du systèmes d'assurance maladie. Avec 199 cas validés d'ototoxicité sévère ayant nécessité la pose d'un appareillage auditif, les incidences cumulées à l'âge de 30 et 50 ans ont été estimées à 2,8% et 5,5%. Nous avons confirmé que l'exposition au cisplatine et sa dose cumulée étaient associées de manière significative à une ototoxicité sévère, tandis que le carboplatine ne l'était pas. Nous avons montré que le risque d'ototoxicité sévère augmentait avec la dose de RT à l'oreille interne, y compris pour les faibles doses (<5 Gy), sans plateau dans l'incidence cumulée, qui continue à augmenter plus de 30 ans après l'exposition à la RT. Nous avons également identifié un effet délétère des expositions au melphalan et au busulfan. Cependant, l'analyse détaillée de ces résultats a montré que l'effet observé du melphalan était très probablement la résultante d'un sur risque important de toxicité auditive sévère chez les patients traités pour neuroblastome par cisplatine. Concernant le busulfan, la question d'une potentialisation de la toxicité auditive de l'irradiation par cet agent alkylant a été posée mais n'a pu être confirmée.

Dans les grandes études de cohorte américaines et suisses portant sur les survivants de cancer pédiatrique, l'incidence cumulée de la perte auditive était de 8% (IC95%=6-11, tous grades) et de 3% (IC 95%=2-3, grade modéré à grave), respectivement plus de 5 ans et 15 ans après le diagnostic de cancer.^{146,147} Dans notre cohorte, l'incidence cumulée de toxicité auditive sévère était similaire, estimée à 2,8% à 30 ans, avec comme définition des cas une déficience auditive sévère nécessitant un appareillage. Cette définition a été utilisée pour réduire le risque de biais de dépistage. De plus, l'identification des cas a été réalisée par validation croisée de diverses sources de données: auto-questionnaires, compte-rendus de consultation de suivi et système de

données de l'assurance maladie, d'où un risque réduit de sous-estimation (par sous-déclaration ou erreur de codage) du port d'appareillage auditif.

Plusieurs études antérieures ont analysé l'ototoxicité du cisplatine et signalé un large intervalle de prévalence de la perte d'audition après exposition au cisplatine dans l'enfance (de 6,9 à 11,5%).¹⁵² À titre de comparaison, dans une étude récente du DCOG (*The Dutch Childhood Oncology Group*), la fréquence de l'ototoxicité était de 29% selon la classification de Brock, tous grades confondus, avec un suivi médian de 8,5 ans.¹⁵³ Dans cette étude, la dose cumulée de cisplatine était associée de manière indépendante à l'ototoxicité, avec un HR de 1,2 (IC95%=1,2-1,5) pour une augmentation de 100 mg/m². Ce résultat est très similaire au notre, avec un HR à 1,2 (1,2-1,3) par augmentation de 100 mg/m². Malgré son impact potentiel, nous n'avons pu évaluer l'effet de la durée de perfusion du cisplatine.¹⁵⁴

Concernant le carboplatine, nous avons confirmé les résultats de l'étude du DCOG concernant l'absence d'effet significatif de la dose cumulée de carboplatine sur la perte d'audition.¹⁵³ Ces résultats semblent être en contradiction avec les rapports antérieurs.^{146,155} En particulier, dans l'étude suisse, il était rapporté un effet significatif de l'exposition au carboplatine mais en utilisant un codage mixte carboplatine/cisplatine : comparativement à l'absence d'exposition au carboplatine et au cisplatine, l'exposition au carboplatine seul était associé à un odds ratio OR=2,4 (IC95%=1,3-4,5), l'exposition au cisplatine seul à un OR=9,4 (5,8-15,0) et l'exposition au carboplatine et au cisplatine à un OR=8,6 (4,8-15,7) ($p<0,001$).¹⁴⁷ Lorsque nous avons testé le même codage, nous avons estimé les HR à 1,5 (0,8-2,6), 3,3 (2,1-5,1) et 2,9 (1,7- 5,0) pour l'exposition au carboplatine, au cisplatine et aux deux, respectivement. Les deux résultats sont en fait très similaires, avec un faible effet du carboplatine seul (positif mais non significatif dans notre étude) et sans effet additif lorsqu'il est associé au cisplatine. Cette dernière affirmation doit être discutée à la lumière des résultats de l'étude DCOG, qui a révélé un effet synergique du carboplatine et du cisplatine. Cette question est très importante car l'absence

d'effet synergique pourrait justifier le remplacement du carboplatine par le cisplatine dans les cas d'ototoxicité au cisplatine. Des données validées concernant l'ototoxicité du carboplatine sont également nécessaires pour calculer un score de risque d'ototoxicité par exposition aux platines. La CCSS a ainsi appliqué un facteur de pondération de 0,25 pour le carboplatine comparativement au cisplatine pour les calculs de doses cumulées de platines.¹⁴⁶ Cependant, un tel facteur de pondération est basé sur l'équivalence de doses en termes d'efficacité et non de toxicité.¹⁵⁶

En ce qui concerne la RT, nous avons confirmé l'impact néfaste des fortes doses à l'oreille interne, avec des HR variant de 6,3 à 14,8 pour les doses de 20-40 Gy et > 40 Gy, respectivement, après ajustement pour l'exposition aux platines. Des études antérieures ont rapporté un impact délétère de doses > 30-40 Gy.^{157,158} Une des conclusions importantes de notre étude est la mise en évidence d'un impact significatif des doses plus faibles à l'oreille interne (<5 Gy et 5-30 Gy). Dans une étude antérieure de la cohorte du St Jude incluant 235 patients traités par radiothérapie crânienne mais sans cisplatine pour tumeurs au cerveau, la dose de RT cochléaire était significativement associée à une perte auditive, mais aucune analyse dose-réponse n'avait été rapportée.¹⁵⁹ In vitro, l'effet délétère des faibles doses de RT sur les cellules ciliées de l'oreille interne a déjà été rapporté et pourrait expliquer les résultats que nous observons.¹⁶⁰ Cependant, d'autres facteurs pourraient également expliquer cet effet néfaste des faibles doses au niveau de l'oreille interne, telles que les dommages microvasculaires induits par l'irradiation de la cochlée, la tumeur cérébrale elle-même ou la neurochirurgie ou chirurgie cervico-faciale. Ainsi, dans notre étude, l'effet d'une dérivation du liquide céphalo-rachidien n'a pas pu être évalué.¹⁵⁹

Enfin, nous rapportons pour la première fois un effet délétère du melphalan et du busulfan. Une analyse détaillée des cas d'ototoxicité après exposition au melphalan ou au busulfan a révélé que presque tous avaient été traités pour un neuroblastome et exposés à une dose élevée de

cisplatine par cycle (200 mg/m²) ou avaient été irradiés pour une tumeur cérébrale. Par conséquent, il est très probable qu'aucun des deux médicaments n'ait d'effet direct sur la survenue d'une ototoxicité sévère. Concernant le melphalan, nous avons en effet mis en évidence une interaction significative entre neuroblastome et exposition au cisplatine rendant compte d'un sur risque important de toxicité auditive sévère chez ces patients comparativement à ceux traités pour une autre pathologie par cisplatine. Le melphalan apparaît dès lors comme un facteur de confusion et non comme un facteur de risque propre de toxicité auditive sévère. Cette interaction entre neuroblastome et cisplatine pourrait s'expliquer par l'utilisation du cisplatine à la dose de 200 mg/m²/cycle dans cette pathologie (vs. <120 mg/m²/cycle dans les autres pathologies). Dans l'essai HRNBL-01, randomisant deux schémas de chimiothérapie à haute dose, busulfan-melphalan (Bu-Mel) vs carboplatine-étoposide-melphalan (CEM), après une chimiothérapie d'induction de type COJEC (cyclophosphamide-vincristine-carboplatine-étoposide-cisplatine) comportant du cisplatine à 80 mg/m²/cycle, une faible prévalence d'ototoxicité sévère était rapportée (3% Bu-Mel contre 6% CEM).¹⁶¹ Dans l'essai ENSG-5 randomisant COJEC et OPEP/OJEC (vincristine-cisplatine-étoposide-cyclophosphamide en alternance avec vincristine-carboplatine-étoposide-cyclophosphamide), comportant du cisplatine à la dose de 80 mg/m²/cycle, la prévalence d'ototoxicité sévère était similaire, estimée à 5,8. % et 5,6% dans chaque bras, respectivement.¹⁶² A l'inverse, dans les essais utilisant une chimiothérapie d'induction avec du cisplatine à 200 mg/m²/cycle, la prévalence de l'ototoxicité sévère était beaucoup plus élevée, variant de 15% à 60%.¹⁶³⁻¹⁶⁷ En conséquence, l'effet de la chimiothérapie d'induction et en particulier de la dose de cisplatine par cycle sur la perte auditive semble être beaucoup plus important que celui de l'intensification. En ce qui concerne le busulfan, sa radiosensibilisation sur le tube digestif et la moelle épinière a déjà été rapportée.^{168,169} Par conséquent, l'hypothèse d'une potentialisation de l'impact délétère de la radiothérapie sur la perte auditive est intéressante et mérite d'être explorée plus en détail, même

si cette potentialisation n'a jusqu'ici jamais été rapportée et si nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence d'interaction significative entre busulfan et RT à l'oreille interne, au moins en partie du fait d'un manque de puissance.

En conclusion, dans cette vaste étude sur les survivants de cancer pédiatrique, nous avons mis en évidence un impact délétère de la RT à l'oreille interne sur l'audition, y compris pour les faibles doses et avec une incidence cumulée continuant à s'aggraver > 30 ans après l'irradiation. La question de la potentialisation de sa toxicité par le busulfan reste posée. Nous avons également identifié une incidence plus élevée d'ototoxicité sévère chez les patients traités par melphalan. Cela pourrait s'expliquer par l'utilisation du cisplatine à 200 mg/m²/cycle dans les chimiothérapies d'induction des neuroblastomes de haut risque. Les polymorphismes pharmacogénétiques impliqués dans l'ototoxicité induite par le platine^{170,171} et la RT sont également à prendre en considération dans les modélisations de risque d'ototoxicité après traitement d'un cancer. Ceci n'a pu être fait dans notre analyse, mais nous espérons dans l'avenir pouvoir intégrer des données génétiques dans les modèles de risque grâce à un vaste programme de génotypage des patients de la cohorte FCCSS.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Les différents travaux ici présentés abordent différents versants de la recherche clinique et épidémiologique en oncologie pédiatrique, intégrant les données biologiques et génétiques. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'impact pronostique de la décroissance de l'AFP dans les tumeurs germinales malignes pédiatriques. Nous avons identifié un impact pronostique défavorable d'une décroissance lente avec une modélisation différente de celle utilisée chez l'adulte du fait des valeurs très élevées beaucoup plus fréquemment observées au diagnostic chez l'enfant. Ce résultat très important car pouvant dans l'avenir conduire à une nouvelle stratification thérapeutique adaptée à la réponse à la chimiothérapie nécessite d'être validée. Nous poursuivrons donc ces travaux par une méta-analyse internationale sur données individuelles. Les données devraient être disponibles début 2020 et les résultats sont attendus pour juin 2020.

Nous avons également étudié l'impact de facteurs constitutionnels sur l'efficacité et la toxicité de la chimiothérapie dans les sarcomes pédiatriques : interaction entre le sexe et le type d'alkylant (cyclophosphamide ou ifosfamide) et étude d'association avec des polymorphismes génétiques. Ces travaux ont montré que l'hypothèse d'une interaction entre le sexe et le type d'alkylant formulée suite à l'analyse des résultats de l'essai international randomisé EuroEWING99 n'était pas valide. En conséquence, le choix de l'alkylant ne peut être aujourd'hui fondé ni sur l'efficacité ni sur la toxicité aiguë et ne peut être fonction du sexe. La question de la toxicité à long terme de ces deux agents de chimiothérapie est essentielle à analyser, et ce en fonction du sexe. Par conséquent, nous avons poursuivi ce travail par une analyse de la toxicité à long terme des patients inclus dans l'essai EuroEWING99 et randomisés pour le traitement d'entretien entre les deux bras VAC (avec cyclophosphamide) et VAI (avec ifosfamide). L'analyse est en cours. Concernant les polymorphismes génétiques impliqués dans la pharmacogénétique du méthotrexate, nos résultats sont en faveur du caractère prédictif de

certaines SNP pour la réponse à la chimiothérapie et la survie. Ceci nécessite d'être validé. Les données biologiques ont été obtenues et l'analyse de validation sera initiée début 2020.

Enfin, nous avons étudié les facteurs de risque de toxicité auditive dans la cohorte française de survivants à long terme de cancers pédiatriques. Nous avons identifié un effet significatif de la dose à l'oreille interne, y compris pour des doses faibles, et mis en évidence qu'un sous-groupe de patients traités pour un neuroblastome de haut risque et intensifiés avec une chimiothérapie à haute dose à base de melphalan et/ou busulfan, et non irradiés sur l'oreille interne, était à très haut risque de toxicité auditive sévère. L'hypothèse formulée pour expliquer ce sur risque important est celui de d'une dose par cycle de cisplatine deux fois supérieure à la dose utilisée dans les autres pathologies cancéreuses pédiatriques (200 mg/m² vs. 70-120 mg/m²/cycle). Ce travail sera poursuivi par l'intégration de données génomiques dès que celles-ci seront disponibles. En effet, nous avons un projet de génotypage systématiques des patients inclus dans le FCCSS de façon à étudier l'effet de polymorphismes génétiques sur les risques de toxicités tardives, et en particulier sur les risques de toxicité auditive. Différentes études ont déjà montré l'association entre SNP et toxicité auditive mais sans validation externe et sans études d'interaction avec les doses d'irradiation à l'oreille interne.

L'intégration des données génétiques est devenue essentielle pour améliorer l'identification des facteurs pronostiques et des facteurs prédictifs de toxicité aiguë et à long terme, s'inscrivant dans le développement de la médecine personnalisée. La médecine personnalisée se comprend comme une médecine globale, holistique, centrée sur le patient, intégrant les soins de support, et capable de considérer dans l'élaboration du programme thérapeutique les particularités individuelles de chacun, et notamment les caractéristiques fondamentales (notamment génétiques) de la tumeur. Néanmoins, pour l'instant, le traitement n'est que rarement adapté à « l'hôte ». Or, il serait possible d'individualiser encore d'avantage le traitement en prenant en considération dans le choix des thérapeutiques ou de leur dose les facteurs individuels en

particulier génétiques de façon à optimiser le traitement et réduire les risques de complications à long terme.

REFERENCES

1. Lacour, B. *et al.* Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur. J. Cancer Prev.* **19**, 173–181 (2010).
2. Desandes, E. *et al.* Cancer incidence and survival in adolescents and young adults in France, 2000–2008. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 291–306 (2013).
3. Zhang, J. *et al.* Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2336–2346 (2015).
4. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78–81 (2015).
5. Hudson, M. M. *et al.* Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA* **309**, 2371–2381 (2013).
6. Mertens, A. C. *et al.* Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 1368–1379 (2008).
7. Reulen, R. C. *et al.* Long-term cause-specific mortality among survivors of childhood cancer. *JAMA* **304**, 172–179 (2010).
8. Armstrong, G. T. *et al.* Modifiable risk factors and major cardiac events among adult survivors of childhood cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3673–3680 (2013).
9. Mulrooney, D. A. *et al.* Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ* **339**, b4606 (2009).
10. Tukenova, M. *et al.* Long-term mortality from second malignant neoplasms in 5-year survivors of solid childhood tumors: temporal pattern of risk according to type of treatment. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 707–715 (2010).
11. Tukenova, M. *et al.* Long-term mortality from second malignant neoplasms in 5-year survivors of solid childhood tumors: temporal pattern of risk according to type of treatment. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 707–715 (2010).
12. de Vathaire, F. *et al.* Thyroid carcinomas after irradiation for a first cancer during childhood. *Arch. Intern. Med.* **159**, 2713–2719 (1999).
13. Mansouri, I. *et al.* The role of irradiated heart and left ventricular volumes in heart failure occurrence after childhood cancer. *Eur. J. Heart Fail.* **21**, 509–518 (2019).
14. El-Fayech, C. *et al.* Cerebrovascular Diseases in Childhood Cancer Survivors: Role of the Radiation Dose to Willis Circle Arteries. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **97**, 278–286 (2017).
15. de Vathaire, F. *et al.* Radiation dose to the pancreas and risk of diabetes mellitus in childhood cancer survivors: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* **13**, 1002–1010 (2012).
16. Allodji, R. S. *et al.* Association of Radiation Dose to the Eyes With the Risk for Cataract After Nonretinoblastoma Solid Cancers in Childhood. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 390–397 (2016).
17. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

18. Blohm, M. E., Vesterling-Hörner, D., Calaminus, G. & Göbel, U. Alpha 1-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **15**, 135–142 (1998).
19. Gale, G. B., O'Connor, D. M. & Chu, J. Y. Normal values of alpha-fetoprotein in neonates and infants. *Pediatrics* **82**, 138 (1988).
20. Ohama, K. *et al.* Alpha-fetoprotein (AFP) levels in normal children. *Eur. J. Pediatr. Surg. Off. J. Austrian Assoc. Pediatr. Surg. Al Z. Kinderchir.* **7**, 267–269 (1997).
21. Schneider, D. T., Calaminus, G. & Göbel, U. Diagnostic value of alpha 1-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin in infancy and childhood. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **18**, 11–26 (2001).
22. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **15**, 594–603 (1997).
23. Baranzelli, M. C., Flamant, F., De Lumley, L., Le Gall, E. & Lejars, O. Treatment of non-metastatic, non-seminomatous malignant germ-cell tumours in childhood: experience of the 'Société Française d'Oncologie Pédiatrique' MGCT 1985-1989 study. *Med. Pediatr. Oncol.* **21**, 395–401 (1993).
24. Baranzelli, M. C. *et al.* Prognostic factors in children with localized malignant nonseminomatous germ cell tumors. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1212–1218 (1999).
25. Frazier, A. L. *et al.* Revised risk classification for pediatric extracranial germ cell tumors based on 25 years of clinical trial data from the United Kingdom and United States. *J. Clin. Oncol.* **33**, 195–201 (2015).
26. Fizazi, K. *et al.* Early predicted time to normalization of tumor markers predicts outcome in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3868–3876 (2004).
27. Massard, C. *et al.* Tumor marker kinetics predict outcome in patients with relapsed disseminated non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann. Oncol.* **24**, 322–328 (2013).
28. Fizazi, K. *et al.* Personalised chemotherapy based on tumour marker decline in poor prognosis germ-cell tumours (GETUG 13): a phase 3, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol.* **15**, 1442–1450 (2014).
29. de la Motte Rouge, T. *et al.* Prognostic significance of an early decline in serum alpha-fetoprotein during chemotherapy for ovarian yolk sac tumors. *Gynecol. Oncol.* **142**, 452–457 (2016).
30. Duhil de Bénazé, G. *et al.* Paediatric dysgerminoma: Results of three consecutive French germ cell tumours clinical studies (TGM-85/90/95) with late effects study. *Eur. J. Cancer* **91**, 30–37 (2018).
31. Fresneau, B. *et al.* Sex-Cord Stromal Tumors in Children and Teenagers: Results of the TGM-95 Study. *Pediatr. Blood Cancer* **62**, 2114–2119 (2015).
32. *WHO classification of tumours of female reproductive organs.* (International Agency for Research on Cancer, 2014).
33. *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs: [... consensus and editorial meeting at the University Hospital Zürich, Zürich, 11-13 March, 2015].* (IARC Press, 2016).
34. Kaplan, E. L. & Meier, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **53**, 457–481 (1958).
35. Rothman, K. J. Estimation of confidence limits for the cumulative probability of survival in life table analysis. *J. Chronic Dis.* **31**, 557–560 (1978).
36. Greenwood, M. The natural duration of cancer. 1–26 (1926).

37. Cox, D. R. Regression Models and Life-Tables. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **34**, 187–220 (1972).
38. Schoenfeld, D. Chi-Squared Goodness-of-Fit Tests for the Proportional Hazards Regression Model. *Biometrika* **67**, 145–153 (1980).
39. Therneau, T., Grambsch, P. & Alvegard, T. A. Martingale-Based Residuals for Survival Models. *Fleming* **77**, 147–160 (1990).
40. Giorgi, R. *et al.* A relative survival regression model using B-spline functions to model non-proportional hazards. *Stat. Med.* **22**, 2767–2784 (2003).
41. Heinze, G. & Schemper, M. A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression. *Biometrics* **57**, 114–119 (2001).
42. Uno, H., Cai, T., Pencina, M. J., D’Agostino, R. B. & Wei, L. J. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat. Med.* **30**, 1105–1117 (2011).
43. Rubin, D. B. Inference and missing data. *Biometrika* **63**, 581–592 (1976).
44. Mann, J. R. *et al.* The United Kingdom Children’s Cancer Study Group’s second germ cell tumor study: carboplatin, etoposide, and bleomycin are effective treatment for children with malignant extracranial germ cell tumors, with acceptable toxicity. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3809–3818 (2000).
45. Billmire, D. F. *et al.* Surveillance after initial surgery for pediatric and adolescent girls with stage I ovarian germ cell tumors: report from the Children’s Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **32**, 465–470 (2014).
46. Rescorla, F. J. *et al.* Surveillance after initial surgery for Stage I pediatric and adolescent boys with malignant testicular germ cell tumors: Report from the Children’s Oncology Group. *J. Pediatr. Surg.* **50**, 1000–1003 (2015).
47. Oberlin, O. *et al.* Long-Term Evaluation of Ifosfamide-Related Nephrotoxicity in Children. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5350–5355 (2009).
48. Le Deley, M.-C. *et al.* Risk of secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: a case-control study by the Société Française d’Oncologie Pédiatrique. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1074–1081 (2003).
49. Williams, S. D. *et al.* Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1435–1440 (1987).
50. Cushing, B. *et al.* Randomized comparison of combination chemotherapy with etoposide, bleomycin, and either high-dose or standard-dose cisplatin in children and adolescents with high-risk malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study--Pediatric Oncology Group 9049 and Children’s Cancer Group 8882. *J. Clin. Oncol.* **22**, 2691–2700 (2004).
51. Lopes, L. F. *et al.* Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1297–1303 (2009).
52. Lopes, L. F. *et al.* Lowered Cisplatin Dose and No Bleomycin in the Treatment of Pediatric Germ Cell Tumors: Results of the GCT-99 Protocol From the Brazilian Germ Cell Pediatric Oncology Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* **34**, 603–610 (2016).
53. Culine, S. *et al.* Refining the optimal chemotherapy regimen for good-risk metastatic nonseminomatous germ-cell tumors: a randomized trial of the Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers (GETUG T93BP). *Ann. Oncol.* **18**, 917–924 (2007).

54. Carver, J. R. *et al.* American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3991–4008 (2007).
55. Hinton, S. *et al.* Cisplatin, etoposide and either bleomycin or ifosfamide in the treatment of disseminated germ cell tumors: final analysis of an intergroup trial. *Cancer* **97**, 1869–1875 (2003).
56. Göbel, U. *et al.* Brain metastases during follow-up of children and adolescents with extracranial malignant germ cell tumors: risk adapted management decision tree analysis based on data of the MAHO/MAKEI-registry. *Pediatr. Blood Cancer* **60**, 217–223 (2013).
57. Marina, N. *et al.* Prognostic factors in children with extragonadal malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2544–2548 (2006).
58. Hsieh, F. Y. & Lavori, P. W. Sample-size calculations for the Cox proportional hazards regression model with nonbinary covariates. *Control. Clin. Trials* **21**, 552–560 (2000).
59. Gaspar, N. *et al.* Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3036–3046 (2015).
60. Oberlin, O. *et al.* Impact of High-Dose Busulfan Plus Melphalan As Consolidation in Metastatic Ewing Tumors: A Study by the Société Française des Cancers de l'Enfant. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3997–4002 (2006).
61. Whelan, J. *et al.* High-Dose Chemotherapy and Blood Autologous Stem-Cell Rescue Compared With Standard Chemotherapy in Localized High-Risk Ewing Sarcoma: Results of Euro-E.W.I.N.G.99 and Ewing-2008. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2018782516 (2018) doi:10.1200/JCO.2018.78.2516.
62. Oberlin, O. *et al.* Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Br. J. Cancer* **85**, 1646–1654 (2001).
63. Le Deley, M.-C. *et al.* Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2440–2448 (2014).
64. Cook, M. B., McGlynn, K. A., Devesa, S. S., Freedman, N. D. & Anderson, W. F. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 1629–1637 (2011).
65. Khamly, K. K. *et al.* Gender-specific activity of chemotherapy correlates with outcomes in chemosensitive cancers of young adulthood. *Int. J. Cancer* **125**, 426–431 (2009).
66. Molife, R., Lorigan, P. & MacNeil, S. Gender and survival in malignant tumours. *Cancer Treat. Rev.* **27**, 201–209 (2001).
67. Bartelink, H. *et al.* Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2040–2049 (1997).
68. Glynne-Jones, R. *et al.* Prognostic factors for recurrence and survival in anal cancer: generating hypotheses from the mature outcomes of the first United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Anal Cancer Trial (ACT I). *Cancer* **119**, 748–755 (2013).
69. Wakelee, H. A. *et al.* Survival differences by sex for patients with advanced non-small cell lung cancer on Eastern Cooperative Oncology Group trial 1594. *J. Thorac. Oncol.* **1**, 441–446 (2006).

70. Collins, M. *et al.* Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2303–2312 (2013).
71. van den Berg, H. *et al.* Impact of gender on efficacy and acute toxicity of alkylating agent -based chemotherapy in Ewing sarcoma: Secondary analysis of the Euro-Ewing99-R1 trial. *Eur. J. Cancer* (2015) doi:10.1016/j.ejca.2015.06.123.
72. Ferrari, S. *et al.* Sex- and age-related chemotherapy toxicity in patients with non-metastatic osteosarcoma. *J. Chemother.* **21**, 205–210 (2009).
73. Paioli, A. *et al.* Chemotherapy-related toxicity in patients with non-metastatic Ewing sarcoma: influence of sex and age. *J. Chemother.* **26**, 49–56 (2014).
74. Wrobel, G. *et al.* Safety assessment of intensive induction therapy in childhood anaplastic large cell lymphoma: Report of the ALCL99 randomised trial. *Pediatr. Blood Cancer* **56**, 1071–1077 (2011).
75. Juergens, C. *et al.* Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr. Blood Cancer* **47**, 22–29 (2006).
76. Franconi, F. & Campesi, I. Pharmacogenomics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: interaction with biological differences between men and women. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 580–594 (2014).
77. Anderson, G. D. Sex and racial differences in pharmacological response: where is the evidence? Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *J. Womens Health* **14**, 19–29 (2005).
78. Waxman, D. J. & Holloway, M. G. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* **76**, 215–228 (2009).
79. Schmetzer, O. & Flörcken, A. Sex differences in the drug therapy for oncologic diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 411–442 (2012) doi:10.1007/978-3-642-30726-3_19.
80. Schemper, M. & Smith, T. L. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control. Clin. Trials* **17**, 343–346 (1996).
81. Grambsch, P. M. & Therneau, T. M. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* **81**, 515–526 (1994).
82. Fisher, D. J., Copas, A. J., Tierney, J. F. & Parmar, M. K. B. A critical review of methods for the assessment of patient-level interactions in individual participant data meta-analysis of randomized trials, and guidance for practitioners. *J. Clin. Epidemiol.* **64**, 949–967 (2011).
83. Cochran, W. G. The Combination of Estimates from Different Experiments. *Biometrics* **10**, 101 (1954).
84. Higgins, J. P. T. & Thompson, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* **21**, 1539–1558 (2002).
85. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* **339**, 71–85 (1992).
86. Stewart, L. A. *et al.* Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses of individual participant data: the PRISMA-IPD Statement. *JAMA* **313**, 1657–1665 (2015).
87. Paulussen, M. *et al.* Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment--cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4385–4393 (2008).

88. Crist, W. M. *et al.* Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3091–3102 (2001).
89. Bramwell, V. H. *et al.* Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**, 311–321 (1987).
90. Buzdar, A. U. *et al.* Ifosfamide versus cyclophosphamide in combination drug therapy for metastatic breast cancer. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 115–120 (1979).
91. Nishida, T., Sugiyama, T. & Yakushiji, M. Cisplatin, epirubicin, and ifosfamide versus cisplatin, epirubicin, and cyclophosphamide in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol. Oncol.* **67**, 230 (1997).
92. Pawinski, A. *et al.* Cyclophosphamide or ifosfamide in patients with advanced and/or recurrent endometrial carcinoma: a randomized phase II study of the EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **86**, 179–183 (1999).
93. Wolbold, R. *et al.* Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* **38**, 978–988 (2003).
94. Lamba, V. *et al.* Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 906–922 (2003).
95. Huvos, A. G., Rosen, G. & Marcove, R. C. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **101**, 14–18 (1977).
96. Rosen, G. *et al.* Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* **49**, 1221–1230 (1982).
97. Fuchs, N. *et al.* Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann. Oncol.* **9**, 893–899 (1998).
98. Bielack, S. S. *et al.* Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* **20**, 776–790 (2002).
99. Provisor, A. J. *et al.* Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* **15**, 76–84 (1997).
100. Smeland, S. *et al.* Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur. J. Cancer* **39**, 488–494 (2003).
101. Bacci, G. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity: long-term results of the Rizzoli's 4th protocol. *Eur. J. Cancer* **37**, 2030–2039 (2001).
102. Graf, N., Winkler, K., Betlemovic, M., Fuchs, N. & Bode, U. Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **12**, 1443–1451 (1994).
103. Crews, K. R. *et al.* High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer* **100**, 1724–1733 (2004).
104. Aquerreta, I., Aldaz, A., Giráldez, J. & Sierrasesúмага, L. Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **42**, 52–58 (2004).

105. Laverdière, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A. & Krajinovic, M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **100**, 3832–3834 (2002).
106. de Deus, D. M. V., de Lima, E. L. S., Seabra Silva, R. M., Leite, E. P. & Cartaxo Muniz, M. T. Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk. Res. Treat.* **2012**, 292043 (2012).
107. Liu, Y. *et al.* Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* **9**, e82681 (2014).
108. Lopez-Lopez, E. *et al.* Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 53–61 (2013).
109. Ramsey, L. B. *et al.* Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood* **121**, 898–904 (2013).
110. Treviño, L. R. *et al.* Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5972–5978 (2009).
111. Rau, T. *et al.* High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 468–476 (2006).
112. Lopez-Lopez, E. *et al.* Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 612–619 (2011).
113. Park, J. A. & Shin, H. Y. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. *Blood Res.* **51**, 50–57 (2016).
114. Hegyi, M. *et al.* Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget* **8**, 9388–9398 (2017).
115. Caronia, D. *et al.* Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. *PLoS One* **6**, e26091 (2011).
116. Lui, G. *et al.* A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Osteosarcoma Patients Treated With High-Dose Methotrexate: Data From the OS2006/Sarcoma-09 Trial. *J. Clin. Pharmacol.* **58**, 1541–1549 (2018).
117. Anderson, C. A. *et al.* Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat. Protoc.* **5**, 1564–1573 (2010).
118. Sauerbrei, W. & Schumacher, M. A bootstrap resampling procedure for model building: application to the Cox regression model. *Stat. Med.* **11**, 2093–2109 (1992).
119. Royston, P. & Sauerbrei, W. *Multivariable model-building: a pragmatic approach to regression analysis based on fractional polynomials for continuous variables*. (Wiley, 2009).
120. Machiela, M. J. & Chanock, S. J. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **31**, 3555–3557 (2015).
121. Machiela, M. J. & Chanock, S. J. LDassoc: an online tool for interactively exploring genome-wide association study results and prioritizing variants for functional investigation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **34**, 887–889 (2018).
122. Hosmer, D. W. & Lemeshow, S. *Applied Logistic Regression: Hosmer/Applied Logistic Regression*. (John Wiley & Sons, Inc., 2000). doi:10.1002/0471722146.

123. Harrell, F. E., Califf, R. M., Pryor, D. B., Lee, K. L. & Rosati, R. A. Evaluating the yield of medical tests. *JAMA* **247**, 2543–2546 (1982).
124. Harrell, F. E., Lee, K. L. & Mark, D. B. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat. Med.* **15**, 361–387 (1996).
125. DeLong, E. R., DeLong, D. M. & Clarke-Pearson, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* **44**, 837–845 (1988).
126. Heinzl, H. Using SAS to calculate the Kent and O’Quigley measure of dependence for Cox proportional hazards regression model. *Comput. Methods Programs Biomed.* **63**, 71–76 (2000).
127. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control* **19**, 716–723 (1974).
128. Yang, J., Wang, Z.-G., Cai, H.-Q., Li, Y.-C. & Xu, Y.-L. Effect of variation of ABCB1 and ABCC3 genotypes on the survival of bone tumor cases after chemotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **14**, 4595–4598 (2013).
129. Yee, S. W. *et al.* Impact of polymorphisms in drug pathway genes on disease-free survival in adults with acute myeloid leukemia. *J. Hum. Genet.* **58**, 353–361 (2013).
130. de Rotte, M. C. F. J. *et al.* ABCB1 and ABCC3 gene polymorphisms are associated with first-year response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* **39**, 2032–2040 (2012).
131. Patiño-García, A., Zalacáin, M., Marrodán, L., San-Julián, M. & Sierrasesúмага, L. Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J. Pediatr.* **154**, 688–693 (2009).
132. Windsor, R. E., Strauss, S. J., Kallis, C., Wood, N. E. & Whelan, J. S. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer* **118**, 1856–1867 (2012).
133. Yang, L.-M., Li, X.-H. & Bao, C.-F. Glutathione S-transferase P1 and DNA polymorphisms influence response to chemotherapy and prognosis of bone tumors. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **13**, 5883–5886 (2012).
134. Goričar, K. *et al.* Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma. *Pharmacogenet. Genomics* **24**, 514–521 (2014).
135. Jabeen, S. *et al.* Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J.* **15**, 385–390 (2015).
136. Hattinger, C. M. *et al.* Candidate germline polymorphisms of genes belonging to the pathways of four drugs used in osteosarcoma standard chemotherapy associated with risk, survival and toxicity in non-metastatic high-grade osteosarcoma. *Oncotarget* **7**, 61970–61987 (2016).
137. Park, J. A. & Shin, H. Y. ATIC Gene Polymorphism and Histologic Response to Chemotherapy in Pediatric Osteosarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **39**, e270–e274 (2017).
138. Hegyi, M. *et al.* Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget* **8**, 9388–9398 (2017).
139. Lambrecht, L. *et al.* The role of the MTHFR C677T polymorphism in methotrexate-induced toxicity in pediatric osteosarcoma patients. *Pharmacogenomics* **18**, 787–795 (2017).
140. Xu, L., Wang, L., Xue, B. & Wang, S. MTHFR variant is associated with high-dose methotrexate-induced toxicity in the Chinese osteosarcoma patients. *J. Bone Oncol.* **13**, 143–147 (2018).

141. Winther, J. F. *et al.* Childhood cancer survivor cohorts in Europe. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **54**, 655–668 (2015).
142. Gurney, J. G. *et al.* Hearing loss, quality of life, and academic problems in long-term neuroblastoma survivors: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatrics* **120**, e1229–1236 (2007).
143. Niclasen, J., Obel, C., Guldager, C., Pleinert, S. & Dammeyer, J. Associations between childhood hearing loss and behavioural and academic difficulties: A Danish cohort study. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **90**, 91–98 (2016).
144. Contrera, K. J., Sung, Y. K., Betz, J., Li, L. & Lin, F. R. Change in loneliness after intervention with cochlear implants or hearing aids. *The Laryngoscope* **127**, 1885–1889 (2017).
145. Brinkman, T. M. *et al.* Treatment-induced hearing loss and adult social outcomes in survivors of childhood CNS and non-CNS solid tumors: Results from the St. Jude Lifetime Cohort Study. *Cancer* **121**, 4053–4061 (2015).
146. Whelan, K. *et al.* Auditory complications in childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 126–134 (2011).
147. Weiss, A. *et al.* Long-term auditory complications after childhood cancer: A report from the Swiss Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr. Blood Cancer* **64**, 364–373 (2017).
148. Khan, A. *et al.* Hearing Loss in Adult Survivors of Childhood Cancer Treated with Radiotherapy. *Child. Basel Switz.* **5**, (2018).
149. Li, Y., Womer, R. B. & Silber, J. H. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **40**, 2445–2451 (2004).
150. Veres, C. *et al.* Retrospective reconstructions of active bone marrow dose-volume histograms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **90**, 1216–1224 (2014).
151. Rey, G., Jouglu, E., Fouillet, A. & Hémon, D. Ecological association between a deprivation index and mortality in France over the period 1997 – 2001: variations with spatial scale, degree of urbanicity, age, gender and cause of death. *BMC Public Health* **9**, (2009).
152. van As, J. W., van den Berg, H. & van Dalen, E. C. Platinum-induced hearing loss after treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD010181 (2016) doi:10.1002/14651858.CD010181.pub2.
153. Clemens, E. *et al.* Determinants of ototoxicity in 451 platinum-treated Dutch survivors of childhood cancer: A DCOG late-effects study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **69**, 77–85 (2016).
154. van As, J. W., van den Berg, H. & van Dalen, E. C. Different infusion durations for preventing platinum-induced hearing loss in children with cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD010885 (2014) doi:10.1002/14651858.CD010885.pub2.
155. Jehanne, M. *et al.* Analysis of ototoxicity in young children receiving carboplatin in the context of conservative management of unilateral or bilateral retinoblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* **52**, 637–643 (2009).
156. Ozols, R. F., Behrens, B. C., Ostchega, Y. & Young, R. C. High dose cisplatin and high dose carboplatin in refractory ovarian cancer. *Cancer Treat. Rev.* **12**, 59–65 (1985).
157. Hua, C., Bass, J. K., Khan, R., Kun, L. E. & Merchant, T. E. Hearing loss after radiotherapy for pediatric brain tumors: effect of cochlear dose. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **72**, 892–899 (2008).
158. Bhandare, N. *et al.* Radiation Therapy and Hearing Loss. *Int. J. Radiat. Oncol.* **76**, S50–S57 (2010).

159. Bass, J. K. *et al.* Hearing Loss in Patients Who Received Cranial Radiation Therapy for Childhood Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, 1248–1255 (2016).
160. Low, W.-K. *et al.* Dose-dependant radiation-induced apoptosis in a cochlear cell-line. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **11**, 2127–2136 (2006).
161. Ladenstein, R. *et al.* Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 500–514 (2017).
162. Pearson, A. D. J. *et al.* High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncol.* **9**, 247–256 (2008).
163. Trahair, T. N. *et al.* Long-term outcomes in children with high-risk neuroblastoma treated with autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **40**, 741–746 (2007).
164. Coze, C. *et al.* NB87 induction protocol for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age: a report from the French Society of Pediatric Oncology. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **15**, 3433–3440 (1997).
165. Kushner, B. H. *et al.* Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **12**, 2607–2613 (1994).
166. Kohler, J. A., Ellershaw, C., Machin, D. & Neuroblastoma Working Group of the Children's Cancer and Leukaemia Group. Response to N7 induction chemotherapy in children more than one year of age diagnosed with metastatic neuroblastoma treated in UKCCSG centers. *Pediatr. Blood Cancer* **49**, 234–239 (2007).
167. Kushner, B. H. *et al.* Reduction from seven to five cycles of intensive induction chemotherapy in children with high-risk neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 4888–4892 (2004).
168. Carrie C, Le Deley MC, Claude L, Alapetite C, Marandet J, Habrand JL, Quetin P, Oberlin O. The radiosensitization effect and toxicity of busulfan containing chemotherapy before radiotherapy for Ewing's sarcomas. *Strahlenther Onkol* **185**, 31 (2009).
169. Seddon, B. M., Cassoni, A. M., Galloway, M. J., Rees, J. H. & Whelan, J. S. Fatal radiation myelopathy after high-dose busulfan and melphalan chemotherapy and radiotherapy for Ewing's sarcoma: a review of the literature and implications for practice. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **17**, 385–390 (2005).
170. Lui, G. *et al.* Association between genetic polymorphisms and platinum-induced ototoxicity in children. *Oncotarget* **9**, 30883–30893 (2018).
171. Clemens, E. *et al.* Genetic Determinants of Ototoxicity During and After Childhood Cancer Treatment: Protocol for the PanCareLIFE Study. *JMIR Res. Protoc.* **8**, e11868 (2019).

ANNEXES

Annexe 1

Is alpha-fetoprotein decline a prognostic factor of childhood non-seminomatous germ cell tumours? Results of the French TGM95 study.

Fresneau B, Orbach D, Faure-Contier C, Sudour-Bonnange H, Vérité C, Gandemer V, Pasquet M, Fasola S, Rome A, Raimbault S, Martelli H, Frappaz D, Le Teuff G, Patte C.

Eur J Cancer. 2018 May;95:11-19. doi: 10.1016/j.ejca.2018.02.029.

Annexe 2

Protocole de la méta-analyse sur l'impact pronostique de la décroissance de l'AFP dans les tumeurs solides pédiatriques :tumeurs germinales et hépatoblastomes

Annexe 3

Investigating the heterogeneity of alkylating agents' efficacy and toxicity between sexes: A systematic review and meta-analysis of randomized trials comparing cyclophosphamide and ifosfamide (MAIAGE study).

Fresneau B, Hackshaw A, Hawkins DS, Paulussen M, Anderson JR, Judson I, Litière S, Dirksen U, Lewis I, van den Berg H, Gaspar N, Gelderblom H, Whelan J, Boddy AV, Wheatley K, Pignon JP, De Vathaire F, Le Deley MC, Le Teuff G.

Pediatr Blood Cancer. 2017 Aug;64(8). doi: 10.1002/pbc.26457.

Annexe 4

A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Osteosarcoma Patients Treated With High-Dose Methotrexate: Data From the OS2006/Sarcoma-09 Trial.

Lui G, Treluyer JM, Fresneau B, Piperno-Neumann S, Gaspar N, Corradini N, Gentet JC, Marec Berard P, Laurence V, Schneider P, Entz-Werle N, Pacquement H, Millot F, Taque S, Freycon C, Lervat C, Le Deley MC, Mahier Ait Oukhatar C, Brugieres L, Le Teuff G, Bouazza N; Sarcoma Group of UNICANCER.

J Clin Pharmacol. 2018 Dec;58(12):1541-1549. doi: 10.1002/jcph.1252.



Original Research

Is alpha-fetoprotein decline a prognostic factor of childhood non-seminomatous germ cell tumours? Results of the French TGM95 study[☆]



B. Fresneau^{a,b,*}, D. Orbach^c, C. Faure-Contier^d, H. Sudour-Bonnange^e,
C. Vérité^f, V. Gandemer^g, M. Pasquet^h, S. Fasolaⁱ, A. Rome^j,
S. Raimbault^a, H. Martelli^k, D. Frappaz^d, G. Le Teuff^{b,l}, C. Patte^a

^a Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Department of Pediatric Oncology, Villejuif, F-94805, France

^b Paris-Saclay University, Paris-Sud University, CESP, INSERM, Villejuif, France

^c SIREDO Oncology Center (Care, Innovation and Research for Children, Adolescents and Young Adults with Cancer), Institut Curie, Paris, France

^d Institut D'Hemato-oncologie Pédiatrique, Department of Pediatric Oncology, Lyon, France

^e Centre Oscar Lambret, Department of Pediatric Oncology, Lille, France

^f Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Onco-hematology, Bordeaux, France

^g Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Onco-hematology, Rennes, France

^h Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Onco-hematology, Toulouse, France

ⁱ Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Onco-hematology, Hôpital Trousseau, AP-HP, France

^j Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Oncology, Marseille, France

^k Centre Hospitalier Universitaire, Department of Pediatric Surgery, Le Kremlin-Bicêtre, France

^l Gustave Roussy, Department of Biostatistics, F94805 Villejuif, France

Received 5 December 2017; received in revised form 1 February 2018; accepted 26 February 2018

KEYWORDS

Germ cell tumours;
Children;
Alpha-fetoprotein
decline;
Prognostic analysis

Abstract Purpose: In adults' non-seminomatous germ cell tumours (NS-GCT), alpha-feto-protein (AFP) decline was identified as an important prognostic factor. We investigated its prognostic value in the French TGM95 study for childhood NS-GCT.

Patients and methods: Three risk groups were defined: low risk (LR: localised and completely resected pS1, AFP<15000 ng/ml), with a 'wait-and-see' strategy; intermediate-risk (IR: localised incompletely resected, AFP<15000 ng/ml) with 3–5 vinblastine-bleomycine-cisplatin courses; high risk (HiR: AFP≥15000 ng/ml and/or metastatic) with 4–6 etoposide-ifosfamide-cisplatin courses. The multivariable prognostic analysis for progression-free survival (PFS) included age (±10 years), primary tumour site (1-testis, 2-ovary, 3-

[☆] Presented at the SIOP 2012 and 2016 meetings.

* Corresponding author: Department of Pediatric Oncology, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. Fax: +33 (0)1 42 11 53 28.

E-mail address: brice.fresneau@gustaveroussy.fr (B. Fresneau).

extragonadal), extent of disease (1-pS1, 2-loco-regional dissemination, 3-metastasis) and AFP ($\pm 10,000$ ng/ml). AFP decline prognostic value was investigated in IR + HiR groups using predicted time to normalisation (TTN), AFP change, and difference between observed and expected (based on AFP half-life) area under the curve (O-E AUC).

Results: From January 1995 to December 2005, 239 patients (median age = 3 years, 60 LR, 65 IR, 114 HiR) were included. Main sites were testis ($n = 66$), ovary ($n = 77$) and sacrococcygeal ($n = 57$). Five-year PFS and OS were 85% (95% confidence interval [CI] = 80–89%) and 93% (89–95%), respectively. Age ≥ 10 years (hazard ratio [HR] = 4.6, 95% CI = 2.1–10.1, $p = 0.0001$) and extragonadal primary (HR = 6.3, 95% CI = 2.0–19.9, $p = 0.005$) were significant prognostic factors. In AFP decline analysis ($n = 151$, 17 events), TTN ($p = 0.61$) and AFP change ($p = 0.10$) were not prognostic, whereas we showed a significant effect of O-E AUC (HR = 2.1, 95% CI = 1.0–4.2, $p = 0.05$).

Conclusion: Age ≥ 10 years and extragonadal tumours remain as poor prognostic factors. Contrary to adults, TTN is not reliable in paediatric NS-GCT. The prognostic value of O-E AUC should be investigated in larger studies.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant germ cell tumours (MGCT) account for 3–5% of malignancies under 15 years of age [1,2]. Cisplatin-based chemotherapy dramatically improved the cure rate of these tumours which is now $>80\%$. A recent analysis from the international MaGIC database identified strong prognostic factors in paediatric MGCT: tumour site, extent of disease, and age at diagnosis [3]. Initial level of Alpha-fetoprotein (AFP) was not retained in final prognostic models. In adults' high risk testicular and extragonadal MGCT, AFP decline was identified as an additional important prognostic factor, leading to treatment intensification in cases of insufficient AFP decline after 1 chemotherapy course [4,5].

Based on previous clinical studies (TGM85 and 90), the French Society of Paediatric Oncology (SFOP, renamed *Société Française des Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent*, SFCE) conducted the TGM95 study for extracranial paediatric MGCT with the use of extent of disease and AFP level at diagnosis for risk stratification [6,7]. This article reports on the therapeutic results for non-seminomatous (NS) MGCT with an extended follow-up and presents multivariable prognostic analyses, including the analysis of the prognostic value of AFP decline which has never been studied in paediatric MGCT.

2. Patients and methods

2.1. Patients

TGM95 was a prospective non-randomised study conducted between January 1995 and December 2005 for patients aged ≤ 18 years with extra-cranial NS-MGCT (patient with seminomatous MGCT or sex cord tumours were also included, but results were published

separately) [8]. Diagnosis of NS-MGCT was defined by high levels of one of the following markers: AFP, human Chorionic Gonadotropin (hCG) and free Beta-chain of hCG (hCG-Beta), or by histopathology according to the WHO classification: yolk sac tumour (YST), choriocarcinoma (CC) and/or embryonal carcinoma (EC) elements [9,10]. In cases of gonadal, sacrococcygeal or mediastinal tumour with high markers levels, histology was not mandatory. The general work up included loco-regional and metastatic evaluations (lung and hepatic, and if positive bone and brain).

2.2. Therapeutic strategy

The therapeutic guidelines were based on a clinical presurgical and postsurgical TNM type classification (Supplementary Table S1) [6,7]. In localised tumours, initial surgery was recommended if a complete and 'non-mutilating' resection including the organ of origin was feasible. In bulky or advanced diseases, preoperative chemotherapy was recommended, followed by delayed surgery with complete removal of any residue and of the organ of origin. Complete resection was defined as follows: *en bloc* tumour resection including the organ of origin, without tumour rupture and with histologically free resection margins (=pS1 in case of initial surgery).

Based on previous TGM studies [6,7], 3 risk groups were defined according to completeness of initial resection (pS1/no-pS1), AFP level ($<$ versus $\geq 15,000$ ng/ml), and metastatic status (M0/M1). In the low risk (LR) group (i.e. pS1 tumours with AFP $< 15,000$ ng/ml), a 'wait-and-see' strategy was adopted, with delayed chemotherapy in cases of biological (AFP increase) and/or radiological progression. In the intermediate risk (IR) group (i.e. incompletely resected or unresectable tumour with AFP $< 15,000$ ng/ml), patients received 3–5 VBP courses (vinblastin

3 mg/m²/d, Days (D) 1–2; bleomycin 15 mg/m²/d, D1–2 and cisplatin 100 mg/m²/d, D3). In the high risk (HiR) group (i.e. metastasis and/or AFP $\geq$ 15,000 ng/ml), patients received 4–6 VIP courses (etoposide 75 mg/m²/d, D1–5; ifosfamide 3g/m²/d, D1–2 and cisplatin 20 mg/m²/d, D1–5). Two chemotherapy courses were administered after marker normalisation. If marker normalisation was not obtained after 3 courses for IR group or 4 courses for HiR group ('slow responders'), treatment plan included a switch to VIP or carboplatin/bleomycin/doxorubicin regimen, respectively.

2.3. Statistical methods

Treatment efficacy outcomes were progression-free survival (PFS, defined from the first day of treatment to malignant progression, relapse or death from any cause, whichever occurred first) and overall survival (OS, defined from the first day of treatment to death from any cause). Growing mature teratoma was not considered as malignant event. PFS and OS were estimated by the Kaplan–Meier method, and 5-year PFS and OS were reported with their Rothman's 95% confidence intervals (95% confidence interval [CI]).

The prognostic analysis was based on PFS (to not take into account second malignancies). First, we built a multivariable Cox's model including age at diagnosis (< versus $\geq$ 10 years), primary tumour site (1-testis, 2-ovary, 3-extragonadal), extent of disease (1-pS1 tumours, 2-loco-regional dissemination, 3-metastatic disease) and AFP level at diagnosis (< versus $\geq$ 10,000 ng/ml, cutoff used in the International Germ Cell Consensus Classification [11]) with no variable selection process. As patients in the LR group were treated with surgery alone in a de-escalation strategy leading to a higher risk of progression compared to IR/HiR groups, we secondary restricted the prognostic analysis to patients in the IR and HiR groups. To reduce small-sample bias, we estimated the hazard ratios (HRs) and its 95% CI with the Firth penalised maximum likelihood approach [12].

Second, we evaluated the AFP decline prognostic value, after controlling for age at diagnosis, primary tumour site and extent of disease, in patients with AFP secreting NS-MGCT treated in the IR and HiR groups and with available AFP measurements before and after the first chemotherapy course. Three approaches were used: the predicted time to AFP normalisation (TTN, as previously published in adults GCT [4], approach 1), AFP change (difference between AFP values before and after the first chemotherapy course, approach 2) and the difference between observed and expected AFP decline area under the curve (AUC, approach 3) (See Supplementary materials). Expected AUC was estimated considering an 'optimal' AFP decline, i.e. according to its half-life (7 days). For the approach 1, TTN was considered as a quantitative or binary variable (good response: TTN < 9 weeks or normalised AFP value after

the first course; poor response: TTN $\geq$ 9 weeks or AFP increase after 1 course), whereas for other approaches, AFP decline variable was considered as quantitative. As AFP distribution was not normal with a high variability, a logarithm transformation was used. All tests were 2-sided with alpha set to 0.05. SAS 9.4 and R 3.0.2 were used for the statistical analyses.

The Institutional Ethics Board was consulted, and consent was obtained from parents or guardians according to national research ethics requirements.

3. Results

Two hundred and thirty-nine patients with NS-MGCT (92 boys, 147 girls, median age: 3 years, range = 0.1–18 years) were included. Patients' characteristics are detailed in Tables 1 and S2. Gonadal tumours accounted for 60%. The most frequent extragonadal site was sacrococcygeal (24%). Tumour markers were measured at diagnosis in all patients except two, and increased in all except one (EC only). Initial histology was available for 156 patients with a first biopsy or surgery (not available for 1 patient). Under the age of 10 years, main histology was exclusive YST $\pm$ immature teratoma (86%). Above 10 years, 44% had exclusive YST, 3% had pure CE or CC, and 53% had mixed GCT. Seventy-nine patients had AFP at diagnosis $\geq$ 15,000 ng/ml. Fifty-two patients (22%) were M1. Initial surgery was performed on 123 patients and considered as complete (pS1) in 60 patients. The other 116 patients received neo-adjuvant chemotherapy. Overall, 60 patients were classified as LR, 65 IR and 114 HiR. After a median follow-up of 5.5 years (range: 0.1–14.2), 32 progressions/relapses, 1 bilateralisation (contralateral gonadic NS-MGCT), 5 s malignancies and 17 deaths occurred (Table S3). All relapses occurred within 2 years of diagnosis. Five-year PFS and OS were 85% (95% CI = 80–89%) and 93% (89–95%), respectively (Fig. 1).

3.1. Low risk group (n = 60)

Tumour progression occurred in 14/60 patients (23%, 6/44 testis, 6/14 ovaries, 2/2 extragonadal), 1–13 months after surgery (median = 4.5). Progression was biological only (n = 2) or radiological $\pm$ biological (n = 11, data not available in 1 case). These 14 patients received delayed chemotherapy (9 VBP, 5 VIP). Two of them suffered from second malignant events (second relapse of ovarian tumour and type V acute myeloid leukaemia, AML). Moreover, 1 girl with an ovarian tumour presented a synchronous type II AML with leukaemic cells harbouring an iso12p. These 3 patients died.

3.2. Intermediate risk group (n = 65)

Thirty patients had surgery first, followed by chemotherapy, whereas 35 received neoadjuvant chemotherapy.

Table 1
Patients' characteristics according to the 3 risk groups and overall.

	Risk groups			Total
	Low risk	Intermediate risk	High risk ^b	
Number of patients	60	65	114	239
Sex				
Male	46 (77%)	18 (28%)	28 (25%)	92 (38%)
Female	14 (23%)	47 (72%)	86 (75%)	147 (62%)
Age at diagnosis				
<10 years	47 (78%)	33 (51%)	66 (58%)	146 (61%)
≥10 years	13 (22%)	32 (49%)	48 (42%)	93 (39%)
AFP at diagnosis				
<15,000 ng/ml	60 (100%)	65 (100%)	35 (31%)	160 (67%)
≥15,000 ng/ml	—	—	79 (69%)	79 (33%)
Presence of metastases				
No	60 (100%)	65 (100%)	62 (54%)	187 (78%)
Yes	—	—	52 (46%)	52 (22%)
Primary tumour site				
Testis	44 (73%)	8 (12%)	14 (12%)	66 (28%)
Ovary	14 (23%)	26 (40%)	37 (32%)	77 (32%)
Sacrococcygeal	1 (2%)	17 (26%)	39 (34%)	57 (24%)
Mediastinum	—	5 (8%)	11 (10%)	16 (7%)
Retroperitoneum	—	4 (6%)	2 (2%)	6 (3%)
Vagina	—	5 (8%)	5 (4%)	10 (4%)
Other ^a	1 (2%)	—	6 (5%)	7 (3%)
Therapeutic sequence				
First surgery	60 (100%)	30 (46%)	33 (29%)	123 (51%)
- Adjuvant CT	14 (23%)	30 (100%)	33 (100%)	77 (63%)
- Second look surgery	—	9 (30%)	10 (30%)	19 (15%)
First CT	—	35 (54%)	81 (71%)	116 (49%)
- Delayed surgery	—	34 (97%)	79 (98%)	113 (97%)
Median follow-up (range) (years)	5.0 (0–12)	5.9 (0–14)	5.5 (0–14)	5.5 (0–14)
Events for PFS	15	8	12	35
Progression	14	2	6	22
Relapse	—	4	6	10
Bilateralisation	—	1	—	1
Death	1	1	—	2 ^c
5-year PFS (95% CI)	74% (61–84%)	87% (77–93%)	89% (82–94%)	85% (80–89%)
Second malignancies	1	2	2	5 ^d
Deaths	3	6	8	17
From tumour	1	5	8	14
From 2nd malignancy	1	—	—	1
From other causes	1	1	—	2 ^c
5-year OS (95% CI)	94% (84–98%)	92% (82–96%)	93% (86–96%)	93% (89–95%)

CT: chemotherapy, PFS: progression-free survival, OS: overall survival, CI: confidence interval.

^a Other sites: uterus, pterygopalatine fossa, nasal cavity, palate, penile shaft, buttock, omentum.

^b Causes of high risk other than AFP ≥ 15,000 ng/ml and metastases: M0 mediastinal tumours for whom bleomycin was contraindicated (2 cases), M0 sphenoid tumour with intracranial extension (1 case), M0 testicular tumour but with large retroperitoneal lymph nodes and high AFP (14,062 ng/ml) and hCG-β (1355 ng/ml) secretion (1 case), and M0 ovarian tumours (3 cases of large ruptured ovarian tumours with no measurement of preoperative marker level and 2 cases of AFP secreting ovarian tumours with a majority of immature teratoma rapidly progressing after surgery).

^c One treatment related death of synchronous type-2 acute myeloid leukaemia (AML) with iso12p (LR group) and 1 accident (IR group).

^d Second malignancies: type-5 AML with t(8; 16) (LR group), hepatic haemangioendothelioma, retroperitoneal GCT (IR group), type-4 AML with del(7q) and inv(16), and malignant transformation of a lung metastasis into a thyroid carcinoma (HiR group).

All patients received VBP regimen, except one who received carboplatin (initial renal failure). Thirteen patients (20%) were switched to VIP because of residual viable cells ($n = 2$), incomplete delayed resection ($n = 3$) or absence of tumour marker normalisation ($n = 8$). The median number of all delivered courses was 4 (range: 2–7). Ten events occurred: 6 progressions/relapses (1/8 testis, 1/26 ovary, 4/31 extragonadal, leading to death in

5/6 cases), 1 bilateralisation, 2 s malignancies and 1 accidental death.

3.3. High risk group ($n = 114$)

Overall, 52 M1 patients, 53 patients with M0 disease but AFP ≥ 15,000 ng/ml and 9 patients with M0 disease and AFP <15,000 ng/ml but considered as HiR for various

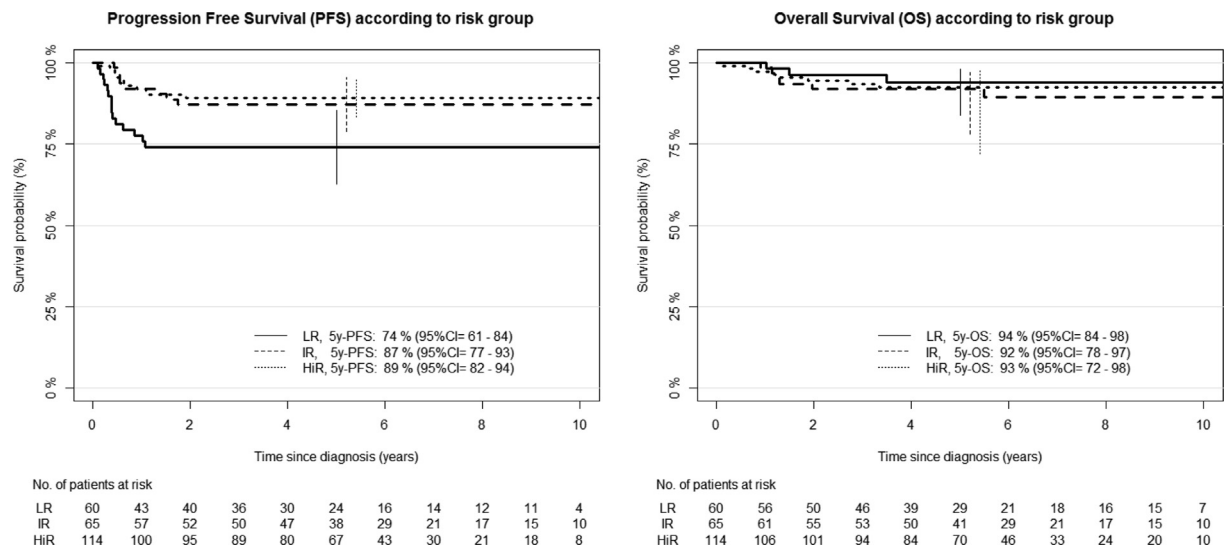


Fig. 1. Kaplan–Meier survival curves of progression-free survival (PFS, left panel) and overall survival (OS, right panel) according to risk group (low, intermediate and high risk). The 5-year survival rates were reported with their Rothman's 95% confidence intervals (95% CI).

reasons were registered in the HiR group (Table 1). Thirty-three patients had surgery first followed by chemotherapy, whereas 81 received neoadjuvant chemotherapy. All received VIP except 2 (VBP, unspecified reasons). Twelve patients switched to carboplatin/bleomycin/doxorubicin ($n = 10$), vinorelbine-ifosfamide-epirubicin ($n = 1$) or VBP ($n = 1$) because of residual viable cells ($n = 5$) or absence of tumour marker normalisation ($n = 7$). Four patients received additional high dose chemotherapy because of residual viable cells after delayed surgery (protocol deviation, 2 etoposide-thiotepa, 2 carboplatin-etoposide-cyclophosphamide). The median number of all delivered courses was 5 (range: 1–9). Fourteen events occurred: 12 progressions/relapses (4/14 testis, 0/37 ovary, 8/63 extragonadal) leading to death in 8/12 cases and 2 malignancies (including 1 patient with 2 events: second malignancy followed by relapse of extragonadal NS-GCT).

PFS curves for each group are reported in Fig. 1.

3.4. Prognostic analysis

In multivariable analysis for PFS ($n = 239$), age ≥ 10 years ($p = 0.0001$), extragonadal primary tumour site ($p = 0.005$) and stage pS1 ($p < 0.0001$) were significantly associated with poorer outcome. AFP level at diagnosis was not associated with PFS ($p = 0.45$) (Table 2). Patients aged ≥ 10 years with extragonadal or testicular tumours had the lowest 5y-PFS (69% and 71%, respectively, Table 3). After restriction to patients treated in IR and HiR groups, only age ≥ 10 years remained significantly associated with PFS ($p = 0.03$). The primary tumour site was marginally significant ($p = 0.06$; Table 2).

Table 2

Prognostic analysis of progression-free survival (PFS) using a multi-variable Cox model (i) on the whole population ($n = 239$) and (ii) in patients treated in intermediate risk (IR) or high risk (HiR) groups without AFP decline ($n = 179$).

Risk factors	Whole population ($n = 239$, 35 events)	IR and HiR groups ($n = 179$, 20 events)
HR (95% CI) p-value		
Age	$p = 0.0001$	$p = 0.03$
<10 years	1	1
≥ 10 years	4.6 (2.1–10.1)	3.7 (1.1–12.4)
Primary tumour site	$p = 0.005$	$p = 0.06$
Testis	1	1
Ovary	1.4 (0.6–3.8)	0.2 (0.05–1.0)
Extragonadal	6.3 (2.0–19.9)	1.3 (0.4–4.9)
Extent of disease	$p < 0.0001$	$p = 0.35$
pS1 tumours	1	—
Loco-regional	0.09 (0.03–0.3)	1
Metastatic	0.2 (0.05–0.6)	1.5 (0.6–3.9)
AFP level at diagnosis	$p = 0.45$	$p = 0.82$
<10,000 ng/ml	1	1
$\geq 10,000$ ng/ml ^a	0.7 (0.3–1.7)	0.9 (0.3–2.4)

HR: hazard ratio, CI: confidence interval.

^a AFP level at diagnosis was $\geq 10,000$ ng/ml in 88 patients: 1 in the LR, 5 in the IR and 82 in the HiR group.

3.5. Prognostic value of AFP decline

Among the 179 patients included in IR and HiR groups, 163 had high AFP level before the first chemotherapy course. AFP measurement after the first course was available in 151 of them (93%, 52 IR, 99 HiR, 17 events, Table S4). The distribution of AFP values before and after the first course and the individual AFP decline profiles were reported in Figs. S1 and S2. Eighty-one patients (54%) were defined as having a 'good response' according to TTN. TTN as continuous or binary was not prognostic for PFS ($p = 0.61$ and 0.68,

Table 3

Five-year progression-free (PFS) and overall survival (OS) according to age at diagnosis and primary tumour sites for the whole population (n = 239, 35 events, 17 deaths).

Age at diagnosis	Primary tumour site	5-y PFS (95% CI)	5-y OS (95% CI)
< 10 years			
	Testis (n = 42)	90% (77–96)	100%
	Ovary (n = 19)	89% (67–97)	94% (73–99)
	Extragenadal (n = 85) ^a	87% (78–93)	93% (85–97)
≥10 years			
	Testis (n = 24)	71% (51–85)	87% (68–96)
	Ovary (n = 58)	86% (74–93)	92% (82–97)
	Extragenadal (n = 11) ^b	69% (38–89)	78% (45–94)

CI: confidence interval.

^a Extragenadal sites before the age of 10 years were: sacrococcygeal (n = 57), vaginal (n = 10), mediatinal (n = 8), retroperitoneal (n = 4) and other (n = 6).

^b Extragenadal sites after the age of 10 years were: mediatinal (n = 8), retroperitoneal (n = 2) and uterine (n = 1).

Table 4, columns 1–2). However, when considering AFP change (approach 2), we observed that the risk of progression/relapse marginally increased when the reduction of AFP during the first 21 days was small

(HR = 2.6 [0.8–8.4], p = 0.10, Table 2, column 3). Moreover, this association became significant when modelling AFP decline by the difference between observed and expected AUC (approach 3, HR = 2.1, 95% CI = 1.0–4.2, p = 0.05, Table 2, column 4).

4. Discussion

The outcome is excellent in TGM95 study (5y-PFS and OS>85%), using cisplatin-based chemotherapy and risk stratification based on completeness of initial resection, AFP level, and metastatic status. We confirmed that age at diagnosis and primary tumour site remain independent prognostic factors, whereas AFP level at diagnosis and metastatic status were no more associated with PFS after treatment stratification on these characteristics. Moreover, contrary to adults' NS-GCTs, we did not identify any significant prognostic value of AFP decline according to TTN, but we showed a significant prognostic value of the difference between observed and expected AFP decline AUC.

In LR patients with localised and completely resected tumours, a 'wait-and-see' strategy was adopted leading

Table 4

Prognostic analysis of AFP decline using different approaches for the progression-free survival (PFS) in patients treated in intermediate or high risk groups (n = 151 patients with high AFP secretion before chemotherapy and with available AFP measurement after the first chemotherapy course, 17 events).

Risk factors	Approach 1 ^b		Approach 2 ^c	Approach 3 ^d
HR (95% CI) p-value	TTN (quantitative)	TTN (binary)	change	(O – E) AUC
Age	p = 0.04	p = 0.03	p = 0.05	0.04
<10 years	1	1	1	1
≥10 years	3.8 (1.1–13.4)	3.9 (1.1–13.6)	3.5 (1.0–12.7)	3.6 (1.1–12.4)
Primary tumour site	p = 0.08	p = 0.07	p = 0.09	0.08
Testis	1	1	1	1
Ovary	0.2 (0.03–1.1)	0.2 (0.03–1.1)	0.2 (0.04–1.1)	0.2 (0.04–1.1)
Extragenadal	1.3 (0.3–5.1)	1.3 (0.3–5.3)	1.3 (0.3–5.1)	1.3 (0.3–5.4)
Extent of disease	p = 0.68	p = 0.72	p = 0.43	0.39
pS1 tumours	—	—	—	—
Loco-regional	1	1	1	1
Metastatic	1.2 (0.5–3.3)	1.2 (0.4–3.3)	1.5 (0.5–4.1)	1.5 (0.6–4.2)
AFP level at diagnosis	p = 0.98	p = 0.92	p = 0.95	
<10,000 ng/ml	1	1	1	
≥10,000 ng/ml	1.0 (0.3–3.1)	0.9 (0.3–2.8)	1.0 (0.3–2.7)	
AFP decline	p = 0.61	p = 0.68	p = 0.10	0.05
	1.0 (0.9–1.0)	0.8 (0.3–2.2) ^e	2.6 (0.8–8.4)	2.1 (1.0–4.2)
AIC^a	156.55	162.80	160.38	157.80

For each approach, a Cox model included age, primary tumour site, and extent of disease.

TTN: predicted time to normalisation, HR: hazard ratio, CI: confidence interval.

See more details about these approaches in supplementary materials.

^a Akaike criterion.

^b In approach 1, we considered the predicted time to AFP normalisation (TTN) as a quantitative or binary variable (good response = normalised AFP value after the first course or TTN <9weeks; poor response = AFP increase after 1 course or TTN ≥ 9 weeks), with adjustment for AFP level at diagnosis (<, ≥10,000).

^c In approach 2, we considered the AFP change (difference between AFP values before and after the first chemotherapy course), with adjustment for AFP level at diagnosis (<, ≥10,000).

^d In approach 3, we considered the difference between observed and expected AFP decline area under the curve (AUC). Observed AUC was defined by the AFP values before and after the first chemotherapy course and expected AUC by the AFP value before the first chemotherapy course and the estimated AFP value after the first chemotherapy course based on AFP half-life.

^e Corresponds to the hazard ratio with good response as the reference.

to avoid chemotherapy to 79% of the patients with gonadal NS-GCT. These results confirm previous published paediatric data in favour of an observation after initial complete surgery for localised and completely resected childhood gonadal GCT [13–15].

In the IR group, we used the VBP regimen resulting in 5y-PFS of 87% (95% CI = 77–93%). This regimen was chosen to avoid ifosfamide with its potential renal toxicity, and VP16 with its potential leukaemogenic effect [16,17]. Bleomycin was given at the dose of 30 mg/m² per course, 2-fold lower than those administered with BEP (bleomycin-etoposide-cisplatin) used in adults [18]. The American Intergroup proposed another alternative regimen in childhood NS-MGCT, similar to BEP but with only 1 dose of bleomycin per course (15 mg/m²) instead of 1 dose per week (PEb) [19]. Other groups used the association of etoposide-cisplatin, thus deleting bleomycin, as a randomised study for intermediate risk adult testicular GCT showed the equivalence of 4 courses of etoposide-cisplatin and 3 courses of BEP [20–22]. However, contrary to VBP, all these regimens are based on etoposide, which potentially exposes patients to the risk of secondary AML. In our series, 2 AML occurred after the etoposide-based VIP regimen.

In the HiR group, the VIP regimen was chosen to combine the most effective drugs, ifosfamide, etoposide, and cisplatin with excellent efficacy (5y-PFS = 89%, 95% CI = 82–94%). This regimen was preferred to BEP to reduce the risk of toxic pulmonary fibrosis related to bleomycin, especially in mediastinal locations, despite its higher hemato-toxicity [23,24]. The German MAKEI group and the Brazilian group also chose the PEI (equivalent to VIP) regimen that avoids high-dose bleomycin in high risk patients [25].

The TGM95 prognostic analysis identified 2 significant poor prognostic factors: age ≥ 10 years and extragonadal primary tumour site. Age ≥ 10 years correlates with the occurrence of mixed GCT and is recognised as prognostic in paediatric series, especially in extragonadal sites [26]. In our series, patients with extragonadal primary tumour sites had a 5y-PFS of 69% if aged ≥ 10 years versus 87% if aged < 10 years. These results are in accordance with those of the multivariable analysis of 519 patients included in the MaGIC database, in which patients aged ≥ 11 years with loco-regionally/metastatic extragonadal tumours or metastatic ovarian tumours had a predicted long-term disease-free survival $< 70\%$ [3]. However, contrary to MaGIC, we did not identify metastatic status as a significant poor prognostic factor. This could be explained by the therapeutic stratification (more intensive and longer chemotherapy in patients with metastasis).

An important point of our study, which has not yet been studied in paediatric GCT is the analysis of AFP decline, a strong prognostic factor in adults with high risk GCT and used for treatment adaptation [4,5,27,28]. Contrary to adults' NS-GCTs, our study did not show

any significant prognostic value of AFP decline according to TTN. One explanation is the large proportion of patients with AFP level $\geq 10,000$ ng/ml (48% in our series versus 5% in Fizazi's study). As AFP half-life is 7 days, patients with AFP $\geq 10,000$ ng/ml before the first chemotherapy course cannot have AFP normalisation in less than 9 weeks. Consequently, this AFP decline model is not suitable in childhood GCT with very high AFP values at baseline. Using other approaches, we identified an increased risk of progression/relapse in cases with slow AFP decline, and especially a significant poorer PFS when the difference between observed and expected AFP decline AUC increased.

This study has some limits. The low number of events underpowered the study and prevented us to perform internal validation studies or subgroup analyses. Moreover, the number of chemotherapy courses was adapted to the response and chemotherapy switches that were allowed in cases of insufficient response (including absence of tumour marker normalisation). Consequently, the prognostic value of AFP decline could have been reduced. In this hypothesis, it would be interesting to analyse the prognostic value of AFP decline in protocols with a fixed number of courses. If tumour markers decline is confirmed as a prognostic marker, it could be used to adapt early the therapeutic strategy, whose objective is to obtain a complete remission, including tumour marker normalisation. In conclusion, we think that this work merits further investigations on larger database, and if possible a meta-analysis of childhood GCT clinical trials.

Funding source

No external funding was secured for this study.

Financial disclosure

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

The authors specially thank Dr MC Baranzelli, who initiated the trial; Dr Anne Aupérin, who was involved in the initial statistical analysis; Florent De Vathaire, who supervised the PhD BF and Ryan Tobias for assistance in editing. The authors also thank the investigators of the following French and Belgium centers, which contributed patients to this study: Gustave Roussy (Villejuif), Institut Curie (Paris), Oscar Lambret (Lille), CHU Toulouse, Léon Bérard (Lyon), CHU

Marseille, CHU Rennes, CHU Nancy, Trousseau hospital (APHP, Paris), CHU Strasbourg, CHU Bordeaux, CHU Grenoble, CHU Nice, CHU Reims, CHU Tours, CHR Bruxelles, CHU Clermont-Ferrand, CHU Montpellier, CHU Saint Etienne, CHU Besançon, CHU Caen, CHU Lille, CHR La Citadelle (Liège), CHU Nantes, CHU Poitiers, CHU Dijon, CHU Limoges, CHU Amiens, CHU Angers and CHU Rouen.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.029>.

References

- [1] Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National children cancer registries, 2000–2004. *Eur J Cancer Prev* 2010;19: 173–81.
- [2] Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, et al. SEER cancer statistics review. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1975–2013. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/. based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. [n.d].
- [3] Frazier AL, Hale JP, Rodriguez-Galindo C, Dang H, Olson T, Murray MJ, et al. Revised risk classification for pediatric extracranial germ cell tumors based on 25 years of clinical trial data from the United Kingdom and United States. *J Clin Oncol* 2015; 33:195–201.
- [4] Fizazi K, Culine S, Kramar A, Amato RJ, Bouzy J, Chen I, et al. Early predicted time to normalization of tumor markers predicts outcome in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3868–76.
- [5] Fizazi K, Pagliaro L, Laplanche A, Fléchon A, Mardiak J, Geoffrois L, et al. Personalised chemotherapy based on tumour marker decline in poor prognosis germ-cell tumours (GETUG 13): a phase 3, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:1442–50.
- [6] Baranzelli MC, Flamant F, De Lumley L, Le Gall E, Lejars O. Treatment of non-metastatic, non-seminomatous malignant germ-cell tumours in childhood: experience of the “Société Française d’Oncologie Pédiatrique” MGCT 1985–1989 study. *Med Pediatr Oncol* 1993;21:395–401.
- [7] Baranzelli MC, Kramar A, Bouffet E, Quintana E, Rubie H, Edan C, et al. Prognostic factors in children with localized malignant nonseminomatous germ cell tumors. *J Clin Oncol* 1999;17: 1212–8.
- [8] Fresneau B, Orbach D, Faure-Contier C, Verité C, Castex MP, Kalfa N, et al. Sex-cord stromal tumors in children and teenagers: results of the TGM-95 study. *Pediatr Blood Cancer* 2015. <https://doi.org/10.1002/pbc.25614>.
- [9] Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, editors. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
- [10] Moch H, International Agency for Research on Cancer, editors. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
- [11] International germ cell Consensus classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International germ cell cancer collaborative group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1997;15:594–603.
- [12] Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression. *Biometrics* 2001;57:114–9.
- [13] Mann JR, Raafat F, Robinson K, Imeson J, Gornall P, Sokal M, et al. The United Kingdom Children’s Cancer Study Group’s second germ cell tumor study: carboplatin, etoposide, and bleomycin are effective treatment for children with malignant extracranial germ cell tumors, with acceptable toxicity. *J Clin Oncol* 2000;18:3809–18.
- [14] Billmire DF, Cullen JW, Rescorla FJ, Davis M, Schlatter MG, Olson TA, et al. Surveillance after initial surgery for pediatric and adolescent girls with stage I ovarian germ cell tumors: report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2014;32:465–70.
- [15] Rescorla FJ, Ross JH, Billmire DF, Dicken BJ, Villaluna D, Davis MM, et al. Surveillance after initial surgery for stage I pediatric and adolescent boys with malignant testicular germ cell tumors: report from the Children’s Oncology Group. *J Pediatr Surg* 2015;50:1000–3.
- [16] Oberlin O, Fawaz O, Rey A, Niaudet P, Ridola V, Orbach D, et al. Long-term evaluation of ifosfamide-related nephrotoxicity in children. *J Clin Oncol* 2009;27:5350–5.
- [17] Le Deley M-C, Leblanc T, Shamsaldin A, Raquin M-A, Lacour B, Sommelet D, et al. Risk of secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: a case-control study by the Société Française d’Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol* 2003;21: 1074–81.
- [18] Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 1987;316:1435–40. <https://doi.org/10.1056/NEJM198706043162302>.
- [19] Cushing B, Giller R, Cullen JW, Marina NM, Lauer SJ, Olson TA, et al. Randomized comparison of combination chemotherapy with etoposide, bleomycin, and either high-dose or standard-dose cisplatin in children and adolescents with high-risk malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study—Pediatric Oncology Group 9049 and Children’s Cancer Group 8882. *J Clin Oncol* 2004;22:2691–700.
- [20] Lopes LF, Macedo CRP, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellarolo MJ, Melaragno R, et al. Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: Brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91. *J Clin Oncol* 2009;27:1297–303.
- [21] Lopes LF, Macedo CRPD, Aguiar SDS, Barreto JHS, Martins GE, Sonaglio V, et al. Lowered Cisplatin dose and No Bleomycin in the treatment of pediatric germ cell tumors: results of the GCT-99 protocol from the Brazilian germ cell pediatric oncology cooperative group. *J Clin Oncol* 2016;34:603–10.
- [22] Culine S, Kerbrat P, Kramar A, Théodore C, Chevreau C, Geoffrois L, et al. Refining the optimal chemotherapy regimen for good-risk metastatic nonseminomatous germ-cell tumors: a randomized trial of the Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers (GETUG T93BP). *Ann Oncol* 2007;18:917–24.
- [23] Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, et al. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol* 2007;25:3991–4008.
- [24] Hinton S, Catalano PJ, Einhorn LH, Nichols CR, David Crawford E, Vogelzang N, et al. Cisplatin, etoposide and either bleomycin or ifosfamide in the treatment of disseminated germ cell tumors: final analysis of an intergroup trial. *Cancer* 2003;97: 1869–75.
- [25] Göbel U, von Kries R, Teske C, Schneider DT, Beyerlein A, Bernbeck B, et al. Brain metastases during follow-up of children and adolescents with extracranial malignant germ cell tumors: risk adapted management decision tree analysis based on data of the MAHO/MAKEI-registry. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:217–23.

- [26] Marina N, London WB, Frazier AL, Lauer S, Rescorla F, Cushing B, et al. Prognostic factors in children with extragonadal malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study. *J Clin Oncol* 2006;24:2544–8.
- [27] Motzer RJ, Nichols CJ, Margolin KA, Bacik J, Richardson PG, Vogelzang NJ, et al. Phase III randomized trial of conventional-dose chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell rescue as first-line treatment for patients with poor-prognosis metastatic germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:247–56.
- [28] Massard C, Kramar A, Beyer J, Hartmann JT, Lorch A, Pico JL, et al. Tumor marker kinetics predict outcome in patients with relapsed disseminated non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol* 2013;24:322–8.

Meta-analysis project concerning the prognostic value of alpha-fetoprotein (AFP) decline in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma

An international collaborative work initiated by
Gustave Roussy, Villejuif, France for the SFCE
And Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA for the COG

Using MaGIC (for pediatric germ cell tumor) and CHIC (for hepatoblastoma) databases

Protocol

October, 2019

SECRETARIAT AND ADVISORY GROUP

Secretariat

Scientific Chair:

Brice Fresneau, MD
Department of Children and Adolescent oncology
Gustave Roussy
114, Rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif Cedex
France
Tél : 00 33 1 42 11 46 22
e-mail: brice.fresneau@gmail.com

Allison O'Neil, MD
Pediatric Oncology
Dana-Farber/Boston Children's Cancer and Blood Disorders Center
450 Brookline Avenue
Boston, Massachusetts 02215
Tel: 617-632-4202
e-mail: allison_oneill@dfci.harvard.edu

Statisticians:

Gwénaél Le Teuff, PhD
Department of Biostatistics and Epidemiology
Gustave Roussy
114, Rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif Cedex
France
Tél : 00 33 1 42 11 49 55
e-mail: gwenael.leteuff@gustaveroussy.fr

Mark Krailo, PhD
Preventive Medicine
Children's Oncology Group Health Sciences Campus
Monrovia, California
Tel : +1 323 442 8233
e-mail: mkrailo@childrensoncologygroup.org

Rudolf Maibach, PhD
IBCSG Coordinating Center, Effingerstrasse 40, CH - 3008 Bern
Tel: +41 31 389 91 96
e-mail : Rudolf.Maibach@ibcsg.org

List of the members of the advisory group

Clinician: Marc Ansari, MD, PhD
Plateforme d'oncologie et d'hématologie pédiatrique
Hôpitaux universitaires de Genève
Tel : +41 22 372 47 31
Email : Marc.Ansari@hcuge.ch

Clinician: Arun.Rangaswami, MD, PhD
Pediatric Hematology-Oncology
University of California San Francisco
Email : Arun.Rangaswami@ucsf.edu

Clinician: Beate Haeberle, PhD, MSc
Department of Pediatric Surgery
Ludwig-Maximilians-University of Munich
Email : Beate.Haeberle@med.uni-muenchen.de

Administrative address:

Meta-analysis project concerning the prognostic value of alpha-fetoprotein (AFP) decline in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma
Department of Biostatistics and Epidemiology
Gustave Roussy
114, rue Edouard Vaillant
94 805 Villejuif cedex, France
Tel: 33 1 42 11 49 55
Fax: 33 1 42 11 52 58

CONTENTS

1. INTRODUCTION AND BACKGROUND	5
2. DESIGN	5
3. OBJECTIVES	5
4. TRIALS SELECTION CRITERIA	6
Trials must have	6
5. TRIALS IDENTIFICATION	6
6. DESCRIPTION OF TRIALS INCLUDED	7
7. ENDPOINTS AND COVARIATES	7
1/ Primary endpoint	8
2/ Secondary endpoints	8
3/ Prognostic factors	8
8. DATA COLLECTION AND QUALITY CONTROL	8
9. STATISTICAL ANALYSIS PLAN	9
10. PROJECT ADMINISTRATION	15
1/Working parties in the meta-analysis	15
2/Practical considerations	15
3/Contacting Trialists	16
11. PUBLICATION POLICY	16
REFERENCES	17
APPENDIX A : DESCRIPTION OF THE ELIGIBLE TRIALS	19
APPENDIX B: HOW TO SEND DATA TO THE SECRETARIAT	21

1. INTRODUCTION AND BACKGROUND

Malignant germ cell tumors (MGCT) account for 3–5% of malignancies under 15 years old.^{1,2} Cisplatin-based chemotherapy dramatically improved the cure rate of these tumors which is now >80%. A recent analysis from the international MaGIC database identified strong prognostic factors in pediatric MGCT: tumor site, extent of disease and age at diagnosis.³ Alpha-fetoprotein (AFP) level at diagnosis was not retained in final prognostic models. In high risk testicular and extragonadic MGCT in adults, AFP decline was identified as an additional important prognostic factor, leading to treatment intensification in cases of insufficient AFP decline after one chemotherapy course.^{4,5} In pediatric MGCT, the French group (Société Française des Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent, SFCE) and the American group (Children Oncology Group, COG) reported a statistically significant prognostic value of AFP decline but using different statistical methods (observed/expected area under the curve AUC for the SFCE and Lange method for the COG) and in small cohorts with low number of events resulting in low power (151 patients and 17 events in the SFCE study, 131 patients and 17 events in the COG study).^{6,7} Consequently, the best way to analyse AFP prognostic value in pediatric MGCT is still on debate and this potential prognostic factor can't be safely used for the moment in clinical practice.

In hepatoblastoma, a rare pediatric tumor but most common liver tumor in children, an extensive meta-analysis of prognostic factors was pursued by the Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) by combining the data of published clinical trials that were started on or after 1988. Higher age (≥ 8 years), low AFP (< 100 ng/ml), metastatic disease, advanced PRETEXT group, macrovascular venous or portal involvement, contiguous extrahepatic disease, primary tumor multifocality and tumor rupture at enrollment were identified as significant poor prognostic factors.^{8,9} However AFP decline was not studied.

To answer to this questions, an international consortium was created to perform meta-analyses of AFP decline prognostic value in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma, using MaGIC and CHIC databases, respectively.

2. DESIGN

A meta-analysis based on updated individual patient data will be carried out and completed with summary data if needed. This approach involves the central collection, validation and analysis of data from all patients from all relevant trials.

3. OBJECTIVES

Assessment of the prognostic value of AFP decline in malignant germ cell tumors (MaGIC) and hepatoblastoma (CHIC database) by studying the following questions:

Main objective

- Role of AFP decline on the progression-free survival

Secondary objectives

- Role of AFP decline on the overall survival

4. TRIALS SELECTION CRITERIA

All trials must satisfy the following criteria:

Trials must have

- Included patients aged ≤ 20 years at diagnosis, with malignant germ cell tumors or hepatoblastoma
- Included more than 50 patients with available individual survival data
- Recorded AFP values at diagnosis, before the first chemotherapy course, before the second chemotherapy course and if possible before each other chemotherapy course, and before surgery
- Have completed accrual from 1988 to June 2017.

Patients should

- Have histologically-proven malignant germ cell tumors or hepatoblastoma
- Have high AFP secretion before chemotherapy and at least one available AFP measurement after the first chemotherapy course

5. TRIALS IDENTIFICATION

The trials selection process was previously detailed in MaGIC and CHIC publications. Concerning the MaGIC database, after signing a memorandum of understanding, which specified the variables to be included in the database and how information was to be deidentified, patient data from seven clinical trials conducted by either CCLG or COG between 1983 and 2009 were included in the initial MaGIC dataset (Table 1). This dataset was secondary enriched by the French TGM95 study⁶ and the Brazilian studies. GCT-91, 98 and 2008^{10,11}. The project was reviewed and exempted by the institutional review board at the Dana-Farber Cancer Institute.

Trial	National Group	Trial Eligibility Criteria	Treatment Regimen	Cycles		No. of Patients
				Length (days)	No.	
GC1 ¹⁵	UK	All patients with MGCTs	Etoposide 120 mg/m ² on days 1 to 3, bleomycin 15 IU/m ² on day 2, cisplatin 100 mg/m ² on day 1	21	n + 2*	14
GC2 ²	UK	All patients with MGCTs	JEB	21	n + 2*	135
INT-0106/POG9048/CCG-8891 ¹⁰	US	Stage II testicular and stage I to II ovarian tumors	PEB	21	4 (+ 2 if PR)	33
INT-0097/POG9049/CCG-8882 ³	US	Stage III to IV gonadal and extragonadal tumors	PEB v HDPEB	21	4 (+ 2 if PR)	250
P9749 ¹²	US	Stage III to IV extragonadal tumors	Amifostine 825 mg/m ² on days 1 to 5 plus HDPEB	21	4 (+ 2 if PR)	26
AGCT01P1 ¹⁶	US	Stage III to IV extragonadal tumors	C-PEB	21	4 (+ 2 if PR)	14
AGCT0132 ¹⁷	US	Stage I to III ovarian, stage I to IV testicular, and stage I to II extragonadal tumors	Compressed PEB	21	3 (+ 3 if PR)	47

Abbreviations: C-PEB, cyclophosphamide, cisplatin, etoposide, and bleomycin; CCG, Children's Cancer Group; HDPEB, cisplatin, etoposide, and bleomycin; JEB, carboplatin, etoposide, and bleomycin; MaGIC, Malignant Germ Cell International Collaborative; MGCT, malignant germ cell tumor; PEB, cisplatin, etoposide, and bleomycin; POG, Pediatric Oncology Group; PR, partial response.
*No. of courses to marker normalization.

Table 1: multicenter prospective clinical trials for pediatric malignant germ cell tumors included in MaGIC database.³

Concerning the CHIC database, as the result of collaborative decisions from the four groups involved in this effort (SIOPEL, COG, GPOH and JPLT), the data collected in the conduct of eight clinical trials were merged into one database for analysis. Trials conducted between 1989 and 2008 and included in this database, are presented in Table 2. All data on 1605 subjects were obtained through the studies which were IRBs approved.

Study	Reference	Number of patients	Enrollment (mm/yyyy)		Event status No event	Median follow up ^a (Range; years)	Number alive at last contact
			Start	End			
HB 89	VonSchweinitz 1995 [14]	72	3/1988	10/1993	53	4.7 (1.6–5.7)	56
HB 99	Haeberle 2003 [15]	141	1/1999	12/2008	103	5.4 (1.5–10.6)	110
INT0098	Ortega 2000 [11]	170	8/1989	12/1992	108	10.3 (0.9–19.2)	120
JPLT 1	Sasaki 2002 [16]	106	12/1990	11/1997	72	5.7 (0.9–16.8)	79
JPLT 2	Hishiki 2011 [17]	298	4/1999	12/2010	212	4.0 (0.2–12.5)	243
P9645	Malogolowkin 2006 [18]; Katzenstein 2009 [13]	277	4/1999	11/2006	190	7.9 (0–11.7)	219
SIOPEL 2	Perilongo 2004 [8]	135	11/1995	5/1998	97	7.4 (0.2–9.4)	100
SIOPEL 3	Perilongo 2009 [9]	406	7/1998	12/2006	319	5.0 (0.2–10.9)	334
Overall		1605	3/1988	12/2010	1154	5.9 (0–19.2)	1271

^a For patients without an EFS-event.

Table 2: multicenter prospective clinical trials for pediatric liver tumors included in CHIC database.⁸

Among these trials, were selected to be included in the meta-analysis all trials with individual patient survival data and available AFP measurements at at least two points, before and after the chemotherapy cycle.

Moreover, all participating trialists were asked to review and supplement a provisional list of trials.

6. DESCRIPTION OF TRIALS INCLUDED

The eligible trials are described in **Appendix A**. For CHIC database, XX trials including XXXX patients with individual patient survival data and available AFP measurements at at least two points, before and after the chemotherapy cycle were included in the meta-analysis. For MaGIC database, XX trials including XXXX patients with individual patient survival data and available AFP measurements at at least two points, before and after the chemotherapy cycle were included in the meta-analysis.

7. ENDPOINTS AND COVARIATES

1/ Primary endpoint

The main endpoint will be progression free survival (PFS) defined as the time from the first day of treatment to malignant progression, relapse or death from any cause, whichever occurred first.

2/ Secondary endpoints

- Overall survival (OS) defined from the first day of treatment to death from any cause
- Best response to the first line treatment from MaGIC database since this information is not available for CHIC database.

3/ Prognostic factors

For MaGIC database, the prognostic factors at baseline that will be considered are:

- AFP at diagnosis
- Age (<, >=10 years)
- Primary site (ovary, testis, extragonadal)
- Metastases (yes/no)
- Surgery first (with or without surgery first)

For CHIC meta-analysis, the prognostic factors at baseline that will be considered are:

- AFP at diagnosis
- Age (<, >=8 years)
- Metastases (yes/no)
- PRETEXT
- VPEFR
- Surgery first (with or without surgery first)

8. DATA COLLECTION AND QUALITY CONTROL

For all eligible trials, basic survival and baseline characteristics will be sought for all patients included into each trial.

Trials' and patients' characteristics

- Trial
- Patient's identifier in the trial
- Sex
- Date of birth
- Date of diagnosis
- Metastases (yes/no)
- Primary site (ovary, testis, extragonadal) (for MaGIC trials only)
- PRETEXT (for CHIC trials only)

- VPEFR (for CHIC trials only)

Treatment data

- Date of randomization and allocated treatment in cases of randomized trial
- Chemotherapy protocol
- Date of each cycle of chemotherapy
- Date of surgery (excluding biopsy)

AFP data

- AFP value at diagnosis
- AFP values before each chemotherapy cycle
- AFP value before surgery
- Date of AFP values if available

Survival data

- Progression / relapse (yes/no)
- Date of progression / relapse
- Second malignant neoplasm (yes/no)
- Date of Second malignant neoplasm
- Survival status
- Date of last follow-up or death
- If death, cause of deaths

Appendix B gives the suggested format and coding to be sent to the Secretariat.

All data will be checked for internal consistency and consistency with trial protocol and published report. Range checks will be performed and extreme values will be checked with the trialists. Each trial will be analyzed individually, and the resulting survival analyses and trial data will be sent to the trials for verification. These controls will be performed by the team in charge of the trial when individual data will be not directly available.

9. STATISTICAL ANALYSIS PLAN

Trial characteristics will be reported in tabular form, information will include patient numbers, period of recruitment, treatment details and median follow-up. A description of AFP over time (spaghetti plot) will be reported by study. Median follow-up will be computed using the reverse Kaplan-Meier method.¹²

For the evaluation of the prognostic value of AFP decline, different statistical modeling of AFP marker will be considered. The general idea is to summarize the repeated measures of AFP over time by one quantity except for the last approach (joint modeling of AFP repeated measurements and time-to-event).

Approach 1

This approach is based on three modeling of AFP proposed by Fresneau et al.⁶ They are defined with available AFP measurements before and after the first chemotherapy course

(baseline = before the first chemotherapy, and 21 days = 3 weeks). So, this approach is based on only two measures. As a day 21 AFP may only be available for a small minority of patients, a multiple imputation technique will be used when AFP at day 21 is missing.

The three AFP decline modeling are:

A- **The predicted time to AFP normalization (TTN)** as previously published in adults germ cell tumors⁴ and used in the GETUG13 study⁵.

TTN was an estimation of the number of weeks necessary to AFP normalization and was calculated as follows:

$$TTN = 3 \times \frac{\log_{10}(M0) - \log_{10}(MN)}{\log_{10}(M0) - \log_{10}(M1)}$$

The factor 3 in this equation represents the time between the first and second measure of AFP i.e 1 cycle = 21 days,

with M0=AFP value before chemotherapy (considered as a proxy of the initial AFP value with or without surgery), M1=AFP value after one course (at day 21, i.e 3 weeks), MN= normal AFP value (fixed at 10 ng/ml).

To define a pattern of favorable and unfavorable AFP decline, patients with normalized AFP value after the first course or TTN <9 weeks were defined as having a good response with favorable AFP decline, whereas patients with AFP increase after one course or with TTN ≥9 weeks were defined as having a poor response with unfavorable AFP decline. A cut-off of 9 weeks for TTN was chosen as it was the median TTN value in our population, and it was the same cut-off used in the original study about TTN.⁴ The prognostic value of TTN was also studied with TTN considered as a quantitative variable.

B- **The AFP change**, difference between M0 (AFP value before chemotherapy) and M1 (AFP value after one course):

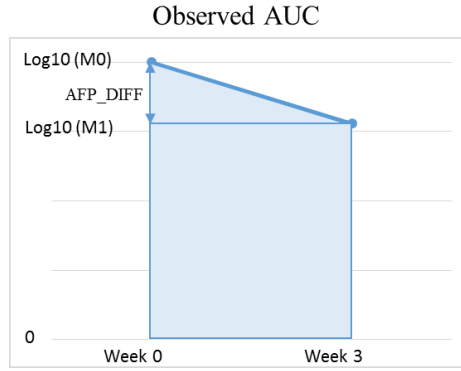
$$AFP_DIFF = \log_{10}(M1) - \log_{10}(M0)$$

In case of AFP decrease, AFP_DIFF has negative value whereas in case of AFP increase, AFP_DIFF has positive value.

C- **The difference between observed and expected AFP decline area under the curve (AUC).**

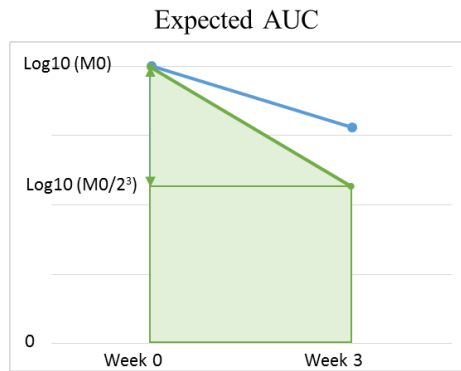
Firstly, we computed the observed AFP_AUC considering observed AFP values before and after the first chemotherapy course.

$$AFP_AUC \text{ observed} = \frac{abs(AFP_DIFF) \times 3}{2} + \log_{10}(M1) * 3$$



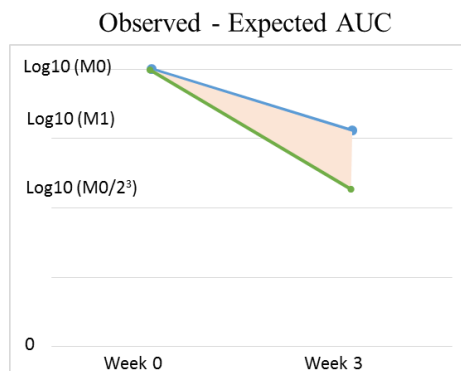
Secondly, we estimated the expected AFP_AUC considering the observed AFP value before the first chemotherapy course and the expected AFP value after one chemotherapy course (3 weeks). The expected AFP value was computed considering an “optimal” AFP decline, i.e. according to its half-life (fixed at 7 days). Consequently, the expected AFP value after the first chemotherapy course was equal to the observed AFP value before the first chemotherapy course divided by 3 half-lives ($=M0/2^3$).

$$\text{AFP_AUC expected} = \frac{(\text{abs}(\log_{10}(\frac{M0}{2^3}) - \log_{10}(M0)) \times 3)}{2} + \log_{10}(\frac{M0}{2^3}) \times 3$$



Thirdly, we calculated the difference between observed and expected AUC (AFP_AUC_DIFF).

$$\text{AFP_AUC_DIFF} = \text{AFP_AUC}_{\text{observed}} - \text{AFP_AUC}_{\text{expected}}$$



AFP_AUC_DIFF equals 0 when the observed AFP value after the first chemotherapy course

is equal to the expected AFP value, and increases when the observed AFP value after the first chemotherapy course deviates from the expected AFP value.

For modeling B and C, AFP decline variable was considered as quantitative. As AFP distribution was not normal with a high variability, a logarithm transformation was used.

Approach 2

This approach used by the COG⁷ is identified as the Lange method¹³. The basis of the Lange method is the calculation of the rate of decline of AFP assuming linear kinetics, that is:

$$k_i = k_1 e^{-\lambda t_i} \quad \text{L [Equation 1]}$$

where: k_1 is the first AFP obtained after the start of chemotherapy

k_i is the AFP obtained at time t_i , $i = 1, K, n_j$

n_j is the total number of AFP determinations performed during induction

λ is the rate of decline of AFP

This was accomplished by performing a linear regression analysis on the dataset $\{(t_i, \ln(k_i))\}_{i=1}^{n_j}$, providing neither k_1 nor k_2 were identified as normal, to provide $-\hat{\lambda}$. The

AFP half-life was estimated as $T_{\frac{1}{2}} = -\frac{\ln\left(\frac{1}{2}\right)}{\hat{\lambda}}$.

A patient with $T_{\frac{1}{2}} \leq 7$ days was considered to have “calculated satisfactory decline” and a

patient with $T_{\frac{1}{2}} > 7$ days was considered to have “unsatisfactory decline”. Any patient where

k_1 or k_2 were identified as normal were classified as “automatically normal”. For some analyses, patients classified as “calculated satisfactory decline” were grouped with patients classified as “automatically normal” to form a group identified as “overall satisfactory decline – yes”.

Relevant Date – Because all AFP measurements obtained during induction are used in the estimation of the rate of decline of AFP, the relevant date for patient p is t_{pn_j} , the date of the last AFP performed during induction for patients classified as “calculated satisfactory decline” or “unsatisfactory decline”. The relevant date for patient q classified as “automatically normal” is t_{q2} .

Approach 3

This approach extends the first approach in the sense that we consider AFP measures over a time-window, defined by a landmark time-point, larger than that used in approach 1 i.e 21 days.¹⁴ Different landmark time-points will be used to evaluate the prognostic value of AFP when considering different time-windows (e.g. landmark time-points corresponding to D21 - or D15 according to protocols - of 2, 3 or 4 chemotherapy cycles). Considering the AFP

decline induced by chemotherapy, we will exclude from the analysis the AFP values obtained after post-chemotherapy surgery. Consequently, AFP data will be censored at the landmark time-point or at surgery if a surgery of the primitive tumor is performed between D1 of the first chemotherapy cycle and the landmark time-point (Figure 1).

As the time of measurements and the number of measurements may vary between patients and between studies, a linear mixed model will be built for modeling the AFP decline over time either by study or globally. Whatever the approach, the model allows

- (i) to estimate individual predictions of AFP value at landmark time-point, and
- (ii) to estimate the individual slope of AFP decline between time origin (D1 of the first chemotherapy cycle) and the landmark time-point.

When the modeling of AFP is performed in each study, the meta-analysis is performed into 2 steps.

When the modeling of AFP is performed using all studies, the meta-analysis is performed into one step.

Other AFP modeling will be defined such as the decrease rate $(AFP_{land} - AFP_0)/(t_{land} - t_0)$ and the relative decrease rate $((AFP_{land} - AFP_0)/AFP_0)/(t_{land} - t_0)$. Consequently, patients with no AFP value at landmark time-point will be excluded from the analysis and no imputation will be done contrary to the approach using a linear mixed model which predict the AFP value at the landmark time for patient with no AFP value at this time.

Whatever the approach used to summarize the AFP decline from 2 points (approach 1), from a model (approach 2) or from a model within a time window (approach 3, using predicted value at landmark time-point, slope, or other methods), a Cox model stratified on study will be used to evaluate the prognostic value of AFP decline. The AFP baseline will be included in the Cox model depending on the modeling of AFP. The stratification allows to take into account the structure of the data. The assumption of log-linearity will be evaluated for continuous AFP- by using the Martingale residuals or spline function. Note that the landmark analysis leads to exclude all patients with a follow-up lower than the landmark time point.

The discriminant ability of model with AFP-modelling will be evaluated by the AUC at a given time and c-index. The calibration of the model will be evaluated by the error prediction using the Brier score.¹⁵ An internal external cross-validation will be performed to validate the model performances.¹⁶ This consists to build the model in excluding one study and to validate the performance of the excluded study.

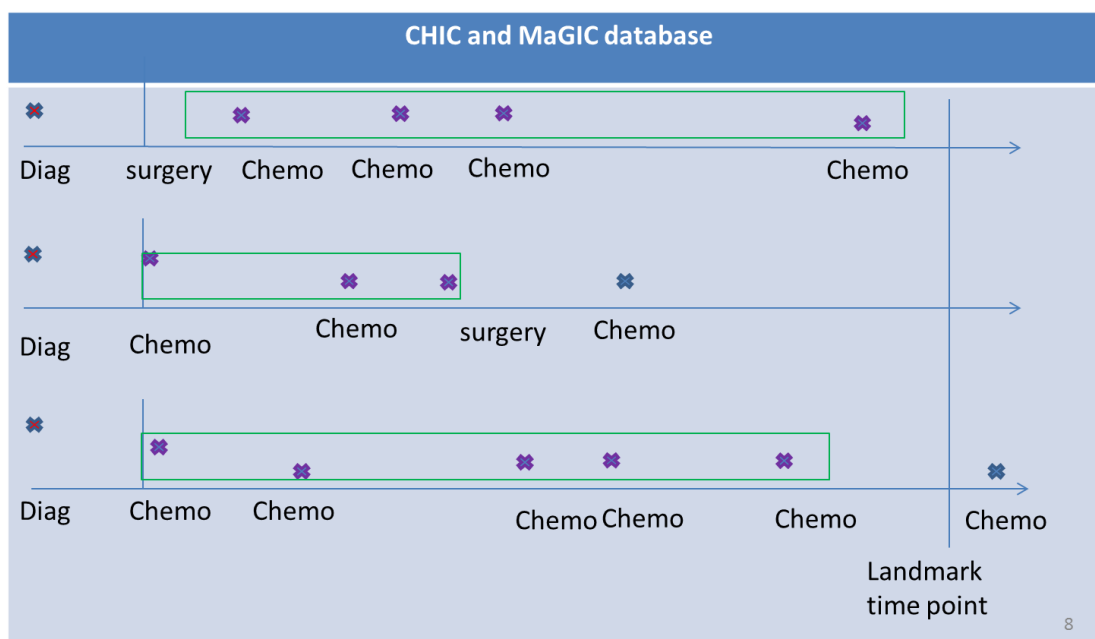


Figure 1: AFP values used for landmark analysis (green).

Approach 4

A joint modeling of AFP decline and time-to-event will be investigated using the approach developed by Rizopoulos et al.¹⁷

For all approaches, the between-study heterogeneity of AFP modelling will be evaluated by an interaction term between AFP modelling and study.

So far, we considered PFS and OS as time-to-event endpoints. A competing approach will be also used. A fine-Gray model stratified on study will be used.

Table 3: Summary of different statistical approaches used for evaluating the prognostic value of AFP decline

Statistical approach	AFP decline modeling
Approach 1: D1-D21	TTN
	AFP Change
	Observed – expected AUC
Approach 2: Lange method	Half-life
Approach 3: Landmark analysis	AFP predicted valued at landmark time-point
Using several AFP values between time origin (D1 of the first chemotherapy cycle) and landmark time-point (D21 or 15 of the 2 nd , 3 rd or 4 th cycle)	Slope
	AFP Change
	Observed – expected AUC

Subgroups analyses: analyses by patient level characteristics

- Patients with a surgery before the first chemotherapy cycle (baseline) and without surgery
- Age (which classes ?)
- Patients with or without metastases
- Primary tumor site for Germ cell tumors
- PRETEXT and VPEFR for hepatoblastoma

The method of pooling of within-trial covariate interaction (PWT) will be used to test treatment-covariate interaction.¹⁸ It consists to compute the treatment-covariate interaction effect for each trial and combine them using the pooled inverse-variance method. Using this method, trials with no patient in some categories will be discarded of the inverse-variance pooled estimation. The assessment of heterogeneity is estimated using the Q statistic

Before analyzing the data, the analysis plan will be finalized following discussion between the members of the Secretariat.

10. PROJECT ADMINISTRATION

1/Working parties in the meta-analysis

In order to realize the meta-analysis successfully, three groups with specific functions will be created: 1) the Secretariat 2) the Advisory Group 3) Meta-analysis project concerning the prognostic value of alpha-fetoprotein (AFP) decline in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma Collaborative Group. The Secretariat is in charge of the coordination of the meta-analysis. It is responsible for completing the trial register and for inviting investigators to provide data available on patients. The Secretariat is also in charge of checking, processing and analyzing the data. Finally, the Secretariat is responsible for preparing reports, publications and works in very close collaboration with the Advisory Group.

The Advisory Group will include international experts in the field of pediatric oncology, involved in malignant germ cell tumors and hepatoblastoma, and experts in meta-analysis. The list of its members will be given at the beginning of the protocol. The Advisory Group will support the Secretariat with medical and methodological expertise, help determine trials relevant to the overview, and promote contact between investigators and all the collaborators.

Meta-analysis project concerning the prognostic value of alpha-fetoprotein (AFP) decline in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma Collaborative Group will include the investigators responsible for trials included in the meta-analysis. The members of the Secretariat and the Advisory Group will also be included in this group. Trialists will be responsible for providing the Secretariat with data on patients and for discussing the reports prepared by the Secretariat and the Advisory Group.

2/Practical considerations

The Secretariat, located in the Meta-Analysis Unit of the Biostatistics and Epidemiology Department at Gustave Roussy, will be responsible for liaising with trialists. The main database will be run by the Secretariat. All data, updating and correction should be sent there. When individual data is not available, the Secretariat send to the principal investigator of the trial, a table with the information needed and the standard operating process used to check the data. All supplied data will remain confidential and used exclusively for the meta-analysis. A meeting of all group members will be organized by the Secretariat to discuss the preliminary results.

3/Contacting Trialists

Trialists will be contacted, informed of the project, invited to collaborate and asked to supply data as outlined in the methods section, invited to participate to the investigator meeting and to review the manuscript(s).

11. PUBLICATION POLICY

The results of the meta-analyses will be published and presented in the name of “Meta-analysis project concerning the prognostic value of alpha-fetoprotein (AFP) decline in pediatric germ cell tumors and hepatoblastoma”, a Collaborative Group study, comprising trialists contributing data for analysis, the Secretariat and Advisory Group. One author from each trial will be co-author, and when appropriate other people who made a significant contribution to this study.

Suggested Timetable

We estimated that the AFP meta-analyses project needs a maximum of 6 months (full time) for a junior statistician.

- September 2019: Feasibility study, search for financial support, invitation of the investigators to participate to the study
- October-December 2019: Activation of the project , Agreement transfer, Finalisation of the protocol
- January 2020: Transfer of database
- January-March 2020: Data collection and data checking of CHIC and MaGIC
- April-May-June 2020: preliminary analysis and trialists meeting
- July 2020: Submission of an abstract
- September 2020: final analysis

REFERENCES

1. Lacour, B. *et al.* Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur. J. Cancer Prev.* **19**, 173–181 (2010).
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
3. Frazier, A. L. *et al.* Revised risk classification for pediatric extracranial germ cell tumors based on 25 years of clinical trial data from the United Kingdom and United States. *J. Clin. Oncol.* **33**, 195–201 (2015).
4. Fizazi, K. *et al.* Early predicted time to normalization of tumor markers predicts outcome in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3868–3876 (2004).
5. Fizazi, K. *et al.* Personalised chemotherapy based on tumour marker decline in poor prognosis germ-cell tumours (GETUG 13): a phase 3, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol.* **15**, 1442–1450 (2014).
6. Fresneau, B. *et al.* Is alpha-fetoprotein decline a prognostic factor of childhood non-seminomatous germ cell tumours? Results of the French TGM95 study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **95**, 11–19 (2018).
7. O'Neill, A. F. *et al.* α -Fetoprotein as a predictor of outcome for children with germ cell tumors: A report from the Malignant Germ Cell International Consortium. *Cancer* (2019). doi:10.1002/cncr.32363
8. Czauderna, P. *et al.* The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **52**, 92–101 (2016).
9. Meyers, R. L. *et al.* Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *Lancet Oncol.* **18**, 122–131 (2017).
10. Lopes, L. F. *et al.* Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1297–1303 (2009).
11. Lopes, L. F. *et al.* Lowered Cisplatin Dose and No Bleomycin in the Treatment of Pediatric Germ Cell Tumors: Results of the GCT-99 Protocol From the Brazilian Germ Cell Pediatric Oncology Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* **34**, 603–610 (2016).
12. Schemper, M. & Smith, T. L. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control. Clin. Trials* **17**, 343–346 (1996).
13. Mazumdar, M. *et al.* Predicting outcome to chemotherapy in patients with germ cell tumors: the value of the rate of decline of human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein during therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 2534–2541 (2001).
14. Ferrer, L., Putter, H. & Proust-Lima, C. Individual dynamic predictions using landmarking and joint modelling: Validation of estimators and robustness assessment. *Stat. Methods Med. Res.* **28**, 3649–3666 (2019).
15. Blanche, P. *et al.* Quantifying and comparing dynamic predictive accuracy of joint models for longitudinal marker and time-to-event in presence of censoring and competing risks. *Biometrics* **71**, 102–113 (2015).
16. Royston, P., Parmar, M. K. B. & Sylvester, R. Construction and validation of a prognostic model across several studies, with an application in superficial bladder cancer. *Stat. Med.* **23**, 907–926 (2004).

17. Rizopoulos, D. *Joint models for longitudinal and time-to-event data: with applications in R*. (CRC Press, 2012).
18. Fisher, D. J., Copas, A. J., Tierney, J. F. & Parmar, M. K. B. A critical review of methods for the assessment of patient-level interactions in individual participant data meta-analysis of randomized trials, and guidance for practitioners. *J. Clin. Epidemiol.* **64**, 949–967 (2011).

APPENDIX A : DESCRIPTION OF THE ELIGIBLE TRIALS

Table 1-A. Characteristics of the eligible trials

Study	Nb. of patients	Inclusion period	x	x	Median follow-up	covariates	AFP measurement		# progression	# death	# relapse		
MaGIC													
CHIC													

References of randomized trials eligible for the meta-analysis

APPENDIX B: HOW TO SEND DATA TO THE SECRETARIAT

FORMAT FOR THE DATA

Please provide data on all patients included in the meta-analysis. Data can be in almost any format (ASCII, Excel, Dbase, SAS...) but please indicate which format has been used. It would be helpful if you used the coding suggested, however you may code the data in the way that is most convenient for you. Please supply us with full details of the data coding system used.

If sending data via email (brice.fresneau@gmail.com), please encrypt the data and let us know how it has been encrypted in a separate email, otherwise send us a compact disk at the administrative address noted at page 2.

Suggested coding and format for sending data by network mail or Compact disk

Variable	Format/Coding
Trials' and patients' characteristics	
• Trial	10 characters
• Patient's identifier in the trial	10 characters
• Sex	1=male, female=2
• Date of birth	DD/MM/YYYY
• Date of diagnosis	DD/MM/YYYY
• Metastases (yes/no)	1=yes, 0=no, 9=missing
• Primary site (ovary, testis, extragonadal) (for MaGIC trials only)	1=ovary, 2=testis, 3=extragonadal, 9=missing
• PRETEXT (for CHIC trials only)	1 digit, 9=missing
• VPEFR (for CHIC trials only)	1 digit, 9=missing
Treatment data	
• Date of randomization and allocated treatment in cases of randomized trial	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
• Chemotherapy protocol	10 characters
• Date of each cycle of chemotherapy	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
• Date of surgery (excluding biopsy)	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
AFP data	
• AFP value at diagnosis	7 digits
• AFP values before each chemotherapy cycle	7 digits
• AFP value before surgery	7 digits
• Date of AFP values if available	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
Survival data	
• Progression / relapse (yes/no)	1=yes, 0=no, 9=missing
• Date of progression / relapse	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
• Second malignant neoplasm (yes/no)	1=yes, 0=no, 9=missing
• Date of Second malignant neoplasm	dd/mm/yyyy, 99999999=missing
• Survival status	0=Alive, 1=Dead
• Date of last follow-up or death	dd/mm/yyyy
If death, cause of deaths	10 characters

RESEARCH ARTICLE

Investigating the heterogeneity of alkylating agents' efficacy and toxicity between sexes: A systematic review and meta-analysis of randomized trials comparing cyclophosphamide and ifosfamide (MAIAGE study)

Brice Fresneau¹ | A. Hackshaw² | D.S. Hawkins³ | M. Paulussen⁴ | J.R. Anderson⁵ |
 I. Judson⁶ | S. Litière⁷ | U. Dirksen⁸ | I. Lewis⁹ | H. van den Berg¹⁰ | N. Gaspar¹ |
 H. Gelderblom¹¹ | J. Whelan¹² | A.V. Boddy¹³ | K. Wheatley¹⁴ | J.P. Pignon^{15,16,17} |
 F. De Vathaire¹⁸ | M.C. Le Deley^{15,16} | G. Le Teuff^{15,16,17}

¹Department of Pediatric oncology, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

²Cancer Research UK & UCL Cancer Trials Centre, University College London, London, United Kingdom

³Division of Hematology/Oncology, Department of Pediatrics, Seattle Children's Hospital, Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington, Seattle, Washington

⁴Vestische Kinder-und Jugendklinik Datteln, Witten/Herdecke University, Datteln, Germany

⁵Merck Research Laboratories—Oncology, North Wales, Pennsylvania

⁶The Royal Marsden NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

⁷Statistics Department, EORTC Headquarters, Brussels, Belgium

⁸Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital, Muenster, Germany

⁹Alder Hey Children's NHS Foundation Trust, Liverpool, United Kingdom

¹⁰Emma Children's Hospital/Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

¹¹Department of Medical Oncology, Leiden University Medical Center/Leiden, The Netherlands

¹²Cancer Medicine and Consultant Medical Oncologist, The London Sarcoma Service, University College Hospital, London, United Kingdom

¹³Faculty of Pharmacy, University of Sydney, Sydney, Australia

¹⁴Cancer Research UK, Cancer Trials Unit, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

¹⁵Departments of Biostatistics and Epidemiology, Gustave-Roussy, Paris, France

¹⁶Paris-Saclay and Paris-Sud Universities, CESP, INSERM, Villejuif, France

¹⁷Gustave Roussy, Ligue Nationale Contre le Cancer Meta-analysis Platform, Villejuif, France

¹⁸Radiation Epidemiology Group, INSERM, UMR1018, Villejuif, France

Correspondence

Brice Fresneau, Department of Pediatric Oncology, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.
 Email: brice.fresneau@gustaveroussy.fr

Abstract

Background: A marginal interaction between sex and the type of alkylating agent was observed for event-free survival in the Euro-EWING99-R1 randomized controlled trial (RCT) comparing cyclophosphamide and ifosfamide in Ewing sarcoma. To further evaluate this interaction, we performed an individual patient data meta-analysis of RCTs assessing cyclophosphamide versus ifosfamide in any type of cancer.

Methods: A literature search produced two more eligible RCTs (EICESS92 and IRS-IV). The end-points were progression-free survival (PFS, main endpoint) and overall survival (OS). The hazard ratios (HRs) of the treatment-by-sex interaction and their 95% confidence interval (95% CI) were assessed using stratified multivariable Cox models. Heterogeneity of the interaction across age

categories and trials was explored. We also assessed this interaction for severe acute toxicity using logistic models.

Results: The meta-analysis comprised 1,528 pediatric and young adult sarcoma patients from three RCTs: Euro-EWING99-R1 ($n = 856$), EICESS92 ($n = 155$), and IRS-IV ($n = 517$). There were 224 PFS events in Euro-EWING99-R1 and 200 in the validation set (EICESS92 + IRS-IV), and 171 and 154 deaths in each dataset, respectively. The estimated treatment-by-sex interaction for PFS in Euro-EWING99-R1 ($HR = 1.73$, 95% $CI = 1.00$ – 3.00) was not replicated in the validation set ($HR = 0.97$, 95% $CI = 0.55$ – 1.72), without heterogeneity across trials ($P = 0.62$). In the pooled analysis, the treatment-by-sex interaction was not significant ($HR = 1.31$, 95% $CI = 0.89$ – 1.95 , $P = 0.17$), without heterogeneity across age categories ($P = 0.88$) and trials ($P = 0.36$). Similar results were observed for OS. No significant treatment-by-sex interaction was observed for leucopenia/neutropenia ($P = 0.45$), infection ($P = 0.64$), or renal toxicity ($P = 0.20$).

Conclusion: Our meta-analysis did not confirm the hypothesis of a treatment-by-sex interaction on efficacy or toxicity outcomes.

KEYWORDS

acute toxicity, alkylating agent, cyclophosphamide, efficacy, ifosfamide, individual patient data, meta-analysis, sarcoma, systematic review, treatment-by sex interaction

1 | INTRODUCTION

The Euro-E.W.I.N.G.99-R1 randomized trial (EE99-R1, NCT00020566)¹ compared the efficacy of cyclophosphamide and ifosfamide combined with vincristine and dactinomycin (Vincristine dactinomycin cyclophosphamide [VAC] vs. vincristine dactinomycin ifosfamide [VAI]) as maintenance treatment in localized standard-risk Ewing sarcoma. We observed that sex marginally modified the treatment effect on event-free survival (EFS, interaction test, $P = 0.083$): in males, VAC was associated with poorer EFS than VAI with a hazard ratio (HR) (VAC/VAI) = 1.34 (95% $CI = 0.96$ – 1.86), whereas VAC was slightly better than VAI in females with an HR = 0.83 (95% $CI = 0.54$ – 1.28).²

Epidemiological studies have reported a higher incidence and mortality among men than women.^{3,4} Registry-based survival analyses adjusted for age and disease stage have also shown that survival tends to be worse in males in various cancers.^{4,5} Moreover, numerous clinical trials of cancer patients report a worse prognosis in males in most studies.^{6–10} There are also sex differences in chemotherapy-related toxicity, especially with alkylating-based chemotherapy, with higher toxicity rates in females, especially hematological toxicity.^{2,10–14} Some of these findings regarding efficacy and toxicity can be explained by pharmacokinetic differences in drug metabolism (e.g., different expression of liver metabolizing enzymes according to sex), leading some authors to propose sex-based dose adaptations.^{15–18}

However, no interaction between the type of alkylating agent (cyclophosphamide or ifosfamide) and sex on efficacy and acute toxicity outcomes was reported before the EE99-R1 trial. In an attempt to confirm the EE99-R1 observation, we conducted a Meta-Analysis on Interaction between Alkylating agents and Gender (MAIAGE) of ran-

domized controlled trials (RCTs) comparing cyclophosphamide versus ifosfamide to confirm whether or not the effect of these two treatments differs between males and females.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Trial selection

To identify an independent validation set for the EE99-R1 data, we undertook a bibliographic search of clinical trials randomizing cyclophosphamide versus ifosfamide (possibly in addition to other drugs but these drugs had to be identical in both arms) in both sex, without restriction on patient age and type of cancer. We searched PubMed and The Cochrane Library for articles published between 1980 and 2013 (any language), and the National Institute of Health clinical trials register (<https://clinicaltrials.gov/>). In addition, all participating trialists were asked to review and supplement a provisional list of trials. Trial selection was accomplished by two authors (BF and GLT) and all relevant articles were reviewed by a third author (MCLD).

Cyclophosphamide and ifosfamide could have been administered either as a single drug or combined with other drugs, but in the latter case, the only difference between the two arms had to be cyclophosphamide and ifosfamide. Differences in the dosage and infusion duration of cyclophosphamide and ifosfamide were allowed across studies. RCTs comparing only one course of cyclophosphamide or ifosfamide were not eligible. Moreover, RCTs for which individual patient data concerning survival and toxicity were not available were excluded.

2.2 | Data extraction and trial quality assessment

Individual patient data were collected for each trial: sex, date of birth, allocated treatment, date of randomization, date of first event, type of first event (progression, relapse, secondary malignancy, death), date of last follow-up or death, survival status, and cause of death (if applicable). We also collected acute toxicity data for leucopenia/neutropenia, thrombocytopenia, infection, mucositis and diarrhea, renal, liver, cardiac, skin, and central and peripheral neurologic toxicities during the randomized period with the grade according to the NCI-CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) grading system. Individual anonymous data were centrally collected (BF and MCLD) and checked using a standard procedure (See Supplementary Methods S1). We noted missing data, data validity, randomization integrity, and follow-up of patients between the two arms.¹⁹

2.3 | Statistical analysis

The primary endpoint was progression-free survival (PFS), defined as the time from randomization to progression, recurrence or death from any cause, whichever occurred first. The secondary endpoint was overall survival (OS), defined as the time from randomization to death from any cause. Patients who had no events were censored at the date of the last follow-up. Analyses were performed on an intention-to-treat basis.

The validation set was analyzed using a multivariable Cox model, stratified by trial and sex, and including treatment (cyclophosphamide vs. ifosfamide) and age as main fixed effects. Age was divided into three categories (<12,^{12–18} and >18 years) with selected cut-offs close to those defining the different pubertal status for males and females. The HR of the treatment effect by sex was measured by an interaction term ("one-stage" model).²⁰ Sensitivity analyses were also performed (see Supplementary Methods S2).

The heterogeneity test was assessed by Cochran's Q-statistics and I^2 .^{21,22} In addition, we performed an exploratory analysis on all RCTs, that is, EE99-R1 and the validation set. Stratified PFS curves were used to calculate the absolute difference at 5 years.²³ All statistical analyses performed for the validation set were also repeated on the pooled dataset. To explore heterogeneity of the treatment-by-sex interaction term across all trials and age categories, a three-order interaction term was included, with the relative two-order interactions terms.

For each type of acute toxicity, the maximum grade was computed for each patient and dichotomized as follows: hematologic toxicity (<, $\geq$ grade-4); mucositis (<, $\geq$ grade-3); diarrhea (<, $\geq$ grade-3); and infection, renal, liver, cardiac, skin, central, and peripheral neurologic toxicities (<, $\geq$ grade-2). The main safety analysis included toxicities that had occurred in at least five males and females in each trial arm to allow interaction analyses: leucopenia/neutropenia, infection, renal toxicity. For each type of toxicity, we estimated the treatment-by-sex interaction term using a logistic regression model stratified by trial and including age category, sex, treatment (main fixed effects), and treatment-by-sex interaction. We assessed the heterogeneity of the interaction across trials using a three-order interaction term between treatment, sex, and trial.

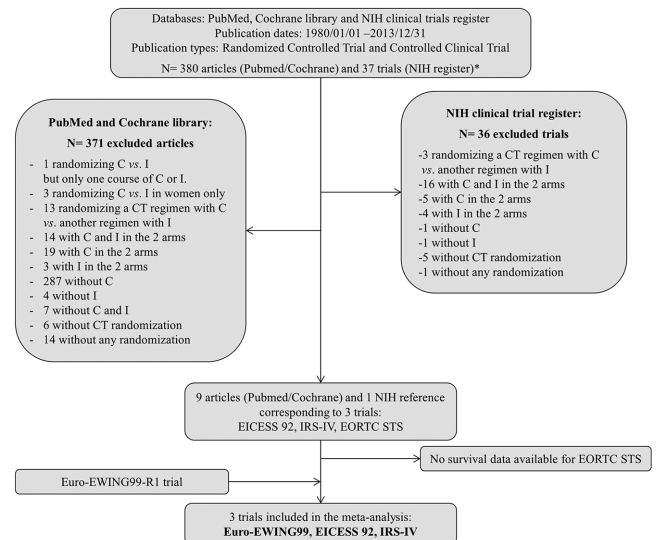


FIGURE 1 Flow chart of trial selection process. C, cyclophosphamide; I, ifosfamide; STS, soft tissue sarcoma.

*The search strategy used the following search terms: "ifosfamide" (Mesh) AND "cyclophosphamide" (Mesh) AND "randomized controlled trial" (Publication Type) OR "controlled clinical trial" (Publication Type) in PubMed, "ifosfamide" AND "cyclophosphamide" in the Cochrane Library, and "Ifosfamide" AND "cyclophosphamide" AND "randomized" in the NIH clinical trials register (<http://www.clinicaltrials.gov>). Note: Euro-EWING99-R1 trial was not yet published when we conducted the systematic review; that is why it does not appear in the initial systematic review box. Actualization of the literature search in November 2016 did not identify any other trial fulfilling the inclusion criteria

All estimates are given with 95% confidence intervals (95% CI) and two-sided *P*-values. Data collection and statistical analyses were performed using SAS Software 9.3. *Coxme* and *Meta R* packages for R version 3.0.2 (<http://www.R-project.org>) were used, respectively, to perform Cox regression models with random treatment effects and forest plots. The results are reported according to PRISMA-IPD recommendations.²⁴

3 | RESULTS

3.1 | Trials description

In addition to the EE99-R1 trial,¹ we identified three trials (EICESS92,²⁵ IRS-IV,²⁶ and an EORTC randomized phase-II trial in soft tissue sarcomas¹) among 380 references of published papers and 37 studies registered on ClinicalTrials.gov (Fig. 1). The EORTC trial was excluded because the individual patient data (survival and toxicity) were not available. We also excluded three randomized trials conducted exclusively in women (breast cancer,²⁸ ovarian epithelial cancer,²⁹ and endometrial adenocarcinoma³⁰). Regarding the IRS-IV trial which compared three parallel groups, we considered the VAI and VAC arms, and excluded the third arm (vincristine-ifosfamide-etoposide arm). Actualization of the literature search in November 2016 did not identify any other trial fulfilling the inclusion criteria.

The three RCTs retained were high-quality phase III trials (See Supplementary Methods S1) comparing cyclophosphamide to ifosfamide in multidrug combinations administered as first-line treatment (Table 1). Sex was considered as a stratification variable in these three trials. The dose ratio of ifosfamide/cyclophosphamide ranged from 4 to 5. In total, 1,528 patients were included, 773 in the cyclophosphamide arm and 755 in the ifosfamide arm. The EE99-R1 trial represented 56% of the total number of patients. These trials were all conducted in sarcomas (Ewing sarcoma, rhabdomyosarcoma, and undifferentiated sarcomas). They included children, adolescents, and young adults, aged <15 years in 66% of the patients (Table 2).

3.2 | Survival analysis

With a median follow-up of 6.8 years (Q1–Q3, 4.5–8.9) (5.9 and 8.0 years in EE99-R1 and the validation set containing EICESS92 and IRS-IV, respectively), we observed 424 disease failures (i.e., PFS events: 224 and 200 in EE99-R1 and the validation set, respectively; progression or relapse in 395 patients and death as first event in 29, including six treatment-related deaths, nine from disease progression, nine other causes, and five unknown causes). There were 325 deaths overall (171 and 154 in EE99-R1 and the validation set, respectively). The estimated treatment-by-sex interaction on PFS in EE99-R1 (HR = 1.73, 95% CI = 1.00–3.00, P -value = 0.051) was not replicated in the validation set (n = 672) using the one-stage model (EICESS92+IRS-IV, HR = 0.97, 95% CI = 0.55–1.72, P = 0.93; Fig. 2), with no heterogeneity between both trials (P = 0.62). Interaction estimates were very similar in the sensitivity analyses (Table 3). In the same way, the estimated treatment-by-sex interaction in EE99-R1 for OS (HR = 1.85, 95% CI = 0.98–3.48, P = 0.056) was not replicated in the validation set (HR = 1.00, 95% CI 0.52–1.92, P = 0.99; Supplementary Fig. S1).

When the three RCTs were pooled, the estimated 5-year absolute PFS benefit associated with ifosfamide compared to cyclophosphamide was greater among males +6.0% (73.7% vs. 67.9%) than females (+0.2%, 75.2% vs. 75.0%; Fig. 3). However, the overall estimate of treatment-by-sex interaction was not statistically significant (HR = 1.31, 95% CI = 0.89–1.95, $P = 0.17$). Although a significant treatment-by-sex interaction was observed in EE99-R1 ($P = 0.051$), this interaction was not statistically different to interaction terms estimated in EICESS92 and IRS-IV trials ($P = 0.36$; Fig. 2). This interaction estimate did not vary across age categories ($P = 0.88$, Supplementary Fig. S2). The sensitivity analyses yielded similar results (last column, Table 3). For OS (Supplementary Fig. S3), the pooled estimate of the treatment-by-sex interaction was not statistically significant (HR = 1.37, 95% CI = 0.87–2.15, $P = 0.17$). We observed neither heterogeneity across trials ($P = 0.35$, Supplementary Fig. S4) nor across age categories ($P = 0.64$, Supplementary Fig. S4). Stable results were observed in the sensitivity analyses (Table 3).

3.3 | Toxicity analysis

The frequencies of severe acute toxicities by sex and treatment arm are shown in Supplementary Table S1. At least one episode of

TABLE 1 Characteristics of selected randomized clinical trials with regimens comparing cyclophosphamide versus ifosfamide

Trial	Accrual period	Type of trial and design	Inclusion criteria			Eligibility criteria for randomization	Randomized regimens		Primary endpoint	Results of ITT ^a analysis
			Median follow-up [Q1–Q3]	N	Pathology	Primary tumor site	Age (years)	Ifo (dose/3 w)	Cyclo (dose/3 w)	
EE99-R1 ^a	2000–2010	Multicentric Phase III and noninferiority	5.9 [3.8–8.0]	856	EWS	Bone or soft tissue	<50	7 VAI (3 g/m ² × 2)	7 VAC (1.5 g/m ² × 1)	3-y EFS 78% (VAI) 75% (VAC)
EICES92 ²⁵	1992–1999	Multicentric Phase III and noninferiority	8.3 [6.9–10.6]	155	ESFT	Bone	<35	10 VAI (2 g/m ² × 3)	10 VACA (1.2 g/m ² × 1)	3-y EFS 74% (VAI) 73% (VACA)
IRS-IV ²⁶	1991–1997	Multicentric Phase III and superiority	8.0 [5.5–9.9]	517	RMS, undifferentiated sarcoma	Soft tissue	<21	8 VAI (1.8 g/m ² × 5)	8 VAC (2.2 g/m ² × 1)	3-y EFS 77% (VAI) 73% (VAC)

CT, chemotherapy; Cyclo, cyclophosphamide; Ifo, ifosfamide; EFS, event-free survival; ESFT, Ewing sarcoma family of tumors; EWS, Ewing sarcoma; N, number of randomized patients; Q1, first quartile; Q3, third quartile; RMS, rhabdomyosarcoma; VAC, vincristine, dactinomycin, cyclophosphamide; adriamycin; VAI, vincristine, dactinomycin, ifosfamide; VAIA, vincristine, dactinomycin, ifosfamide, adriamycin; w, week; y, year.

a) Intention to treat.

^dPatients with either a good histologic response to preoperative treatment (<10% cells), or a small tumor (<200 mL) resected at diagnosis or with radiotherapy alone as local treatment.

After exclusion of patients with completely resected paratesticular tumors, completely resected or microscopically residual disease of orbit or eyelid tumors, preexisting renal abnormalities,

TABLE 2 Characteristics of randomized patients in each trial included in the meta-analysis

	EE99-R1		EICESS92		IRS-IV		Pooled dataset	
	VAI (n = 425)	VAC (n = 431)	VAIA (n = 76)	VACA (n = 79)	VAI (n = 254)	VAC (n = 263)	Ifo arm (n = 755)	Cyclo arm (n = 773)
Sex								
Male	251	258	46	49	141	152	438	459
Female	174	173	30	30	113	111	317	314
Age (years)								
Median	14.0	14.6	15.4	13.8	6.0	5.0	11.8	12.0
[0–10]	120	99	17	18	172	190	309	307
[10–15]	127	127	19	31	54	39	200	197
[15–20]	88	107	23	17	28	32	139	156
≥20	90	98	17	13		2	107	113
Pathology								
ESFT	415	416	73	77			488	493
RMS					234	248	234	248
Other bone sarcoma	1	1	1				2	1
Other STS	10	14	2	2	20	15	32	31
Tumor stage								
Localized disease	425	430	72	78	244	253	741	761
Metastatic disease		1	3	1			3	2
NA			1		10	10	11	10
Number of events	106	118	28	28	62	82	196	228
Progression/relapse	102	115	27	27	55	69	184	211
Death as first event	4	3	1	1	7	13	12	17
Number of deaths	83	88	18	21	51	64	152	173

CT, chemotherapy; Cyclo, cyclophosphamide; Ifo, ifosfamide; ESFT, Ewing sarcoma family of tumors; RMS, rhabdomyosarcoma; NA, not applicable; STS, soft tissue sarcoma; VAC, vincristine, dactinomycin, cyclophosphamide; VACA, vincristine, dactinomycin, cyclophosphamide, adriamycin; VAI, vincristine, dactinomycin, ifosfamide; VAIA, vincristine, dactinomycin, ifosfamide, adriamycin.

severe acute neutropenia, infection, and renal toxicity had occurred in 69.8, 52.8, and 7.8% of patients, respectively. As illustrated in Supplementary Figs. S5–S7, no significant interaction was identified between sex and alkylating agent for leucopenia/neutropenia (odds ratio [OR] = 0.82, 95% CI = 0.49–1.36, $P = 0.43$), infection (OR = 1.11, 95% CI = 0.71–1.71, $P = 0.65$), or renal toxicity (OR = 1.71, 95% CI = 0.76–3.85, $P = 0.19$). These estimates did not significantly vary across trials (heterogeneity tests for leucopenia/neutropenia: $P = 0.81$, infection: $P = 0.12$, and renal toxicity: $P = 0.19$). The main effects were reported because no interaction was found between treatment and sex. Compared to ifosfamide, patients receiving cyclophosphamide experienced more severe leucopenia/neutropenia ($OR_{\text{cyclo vs. ifo}} = 1.47$, 95% CI = 1.14–1.88, $P = 0.003$) and infections ($OR_{\text{cyclo vs. ifo}} = 1.55$, 95% CI = 1.25–1.93, $P < 0.0001$), but less renal toxicity ($OR_{\text{cyclo vs. ifo}} = 0.71$, 95% CI = 0.48–1.06, $P = 0.098$). Regardless of treatment arm, females developed significantly more severe leucopenia/neutropenia ($OR_{\text{female vs. male}} = 1.39$, 95% CI = 1.08–1.79, $P = 0.013$) and infections ($OR_{\text{female vs. male}} = 1.25$, 95% CI = 1.01–1.56, $P = 0.041$) than males, but not significantly more severe renal toxicity ($OR_{\text{female vs. male}} = 1.22$, 95% CI = 0.83–1.82, $P = 0.32$).

4 | DISCUSSION

Using an independent validation set of two RCTs (EICESS92 and IRS-IV), we did not replicate the treatment-by-sex interactions observed in the EE99-R1 trial on PFS and OS. No significant interactions were observed when the three trials were pooled, with no significant heterogeneity across age and trials. Similarly, we did not identify any treatment-by-sex interaction on leucopenia/neutropenia, infection, and renal toxicity. Cyclophosphamide was significantly more hematotoxic (leucopenia/neutropenia and infections) than ifosfamide. We also observed more hematotoxicity in women than in males regardless of treatment arm.

This individual patient data meta-analysis is the first to assess a potential interaction between the type of alkylating agent and sex. Based on high-quality RCTs comparing cyclophosphamide to ifosfamide in both sex, with a total number of patients exceeding 1,500 and long follow-up, it provides an unbiased estimate of the treatment-by-sex interaction. Finally, even though the search was not restricted to age or to a specific type of cancer, these three trials included mainly pediatric and young adult patients, with Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma under first-line treatment. This probably reduces

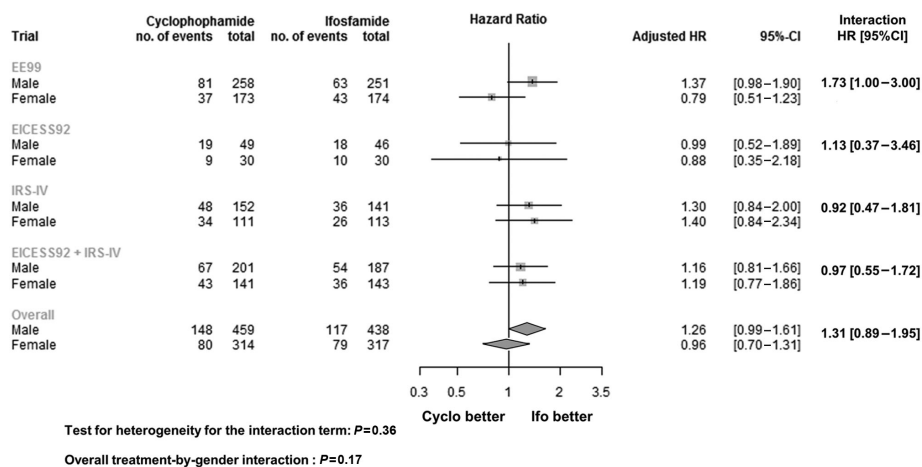


FIGURE 2 Forest plot of the hazard ratios (HRs) of progression-free survival in the cyclophosphamide (Cyclo) arm versus the ifosfamide (Ifo) arm by sex using fixed effects model. HRs given on the right side represent the HR of the treatment-by-sex interaction (HRCyclo/Ifo in males/HRCyclo/Ifo in females) estimated independently for each trial, in the validation set and in the pooled dataset, by the one-stage model, stratified by trial and sex, and including treatment (cyclophosphamide vs. ifosfamide) and age (<12, 12–18, and >18 years) as the main fixed effects. The heterogeneity of the interaction across trials was assessed using a three-order interaction term. The center of each square represents the HR for individual trials and for the validation set (EICESS92 + IRS-IV) and the corresponding horizontal line its 95% confidence interval (CI). The area of squares is proportional to the amount of information obtained from the trial. The center of the black diamond represents the overall HR and the extremities of the diamond represent its 95% CI, both estimated from the pooled dataset

TABLE 3 Estimate of the hazard ratio of the treatment-by-gender interaction term for progression-free survival and overall survival for EE99-R1 (training set), EICESS92 + IRS-IV (validation set), and the pooled dataset in the main and sensitivity analyses

	Training set EE99-R1 (n = 856)	Validation set EICESS92 + IRS-IV (n = 672)	Pooled analysis EE99-R1 + EICESS92 + IRS-IV (n = 1528)
	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)
Progression-free survival			
Main analysis: OSM, fixed effects, age category	1.73 (1.00–3.00), $P=0.051$	0.97 (0.55–1.72), $P=0.93$	1.31 (0.89–1.95), $P=0.17$
Sensitivity analyses			
OSM, random effects, age category	1.73 (1.00–3.00), $P=0.051$	0.98 (0.55–1.73), $P=0.93$	1.32 (0.89–1.95), $P=0.17$
OSM, fixed effects, age continuous	1.71 (0.98–2.96), $P=0.057$	0.96 (0.55–1.71), $P=0.90$	1.31 (0.89–1.95), $P=0.17$
PWT, fixed effects, age category		0.97 (0.55–1.73), $P=0.92$	1.32 (0.88–1.96), $P=0.18$
Overall survival			
Main analysis: OSM, fixed effects, age category	1.85 (0.98–3.48), $P=0.056$	1.00 (0.52–1.92), $P=0.99$	1.37 (0.87–2.15), $P=0.17$
Sensitivity analyses			
OSM, random effects, age category	1.85 (0.98–3.48), $P=0.056$	1.00 (0.52–1.93), $P=1.00$	1.37 (0.87–2.16), $P=0.17$
OSM, fixed effects, age continuous	1.80 (0.96–3.38), $P=0.068$	0.99 (0.51–1.91), $P=0.98$	1.37 (0.87–2.16), $P=0.17$
PWT, fixed effects, age category		0.99 (0.51–1.91), $P=0.98$	1.37 (0.87–2.16), $P=0.17$

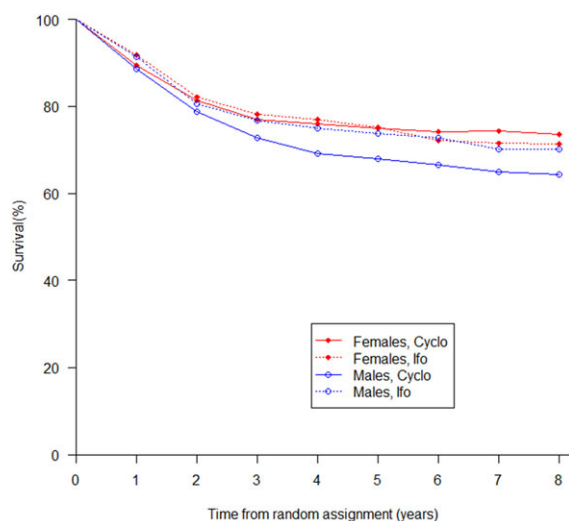
OSM, one-stage model; PWT, pooling of within-trial covariate interactions model; age category: <12^{12–18} and >18 years.
HR: hazard ratio of the treatment-by-gender interaction term (HR Cyclo vs. Ifo in males/HR Cyclo vs. Ifo in females).

sources of heterogeneity across trials (e.g., pharmacodynamic differences and co-morbidity).

The EORTC trial²⁷ that randomized cyclophosphamide and ifosfamide as a single drug in advanced or metastatic soft-tissue sarcomas (n = 135 patients) was not included in the MAIAGE study due to the lack of availability of individual survival or toxicity data after contacting the principal investigator. This study reported lower response rates in the cyclophosphamide arm than in the ifosfamide arm, especially in males (observed response rate of 0% and 11% in males treated with cyclophosphamide and ifosfamide, respectively, and 17% and 23%

in females). Based on these data, we did not observe any significant heterogeneity of the treatment effect between sexes (interaction test: $P=0.12$). In the three other randomized trials excluded (because they were based on women only, see Supplementary Table S2),^{28–30} a better prognosis was reported in two, in subgroups of women treated with ifosfamide,^{29,30} whereas the difference was not significant in the third trial.²⁸

Our study had some limitations. First, none of the trials analyzed were initially designed to study a treatment-by-sex interaction. Due to the observed number of events in each trial and when pooled, the



No. of deaths / person-years by period

Females-Ifo	25/295	29/260	11/223	3/192	4/172	6/138	1/110	0/87
Females-Cyclo	33/294	24/258	13/233	3/203	2/182	2/161	0/136	1/107
Males-Ifo	37/416	45/359	15/318	7/284	4/243	3/214	6/171	0/125
Males-Cyclo	51/424	43/360	25/311	14/269	4/238	4/201	4/160	1/119

FIGURE 3 Stratified progression-free survival (PFS) curves according to sex and alkylating agent (cyclophosphamide or ifosfamide) when the three RCTs were pooled ($n = 1,528$). The 5-year absolute PFS benefit associated with ifosfamide (Ifo) compared to cyclophosphamide (Cyclo) was estimated at 6% in males (73.7% vs. 67.9%), whereas females receiving ifosfamide or cyclophosphamide had similar PFS (75.2% vs. 75.0%, difference = 0.2%)

analyses could be underpowered to test the interaction with a standard statistical level ($P < 0.05$), let alone to detect heterogeneity of the treatment-by-sex interaction across trials (e.g., infection analysis with marginal heterogeneity across trials, $P = 0.12$). Although we did not validate a treatment-by-sex interaction on efficacy outcomes, our results do not conclusively rule out the existence of an interaction.

Second, in addition to the index trial, we identified only two other RCTs, which together contributed less than 50% of the total number of patients. We did not identify any other study comparing cyclophosphamide and ifosfamide, hence there is a paucity of independent trials. Finally, differences in population characteristics and in drug combinations in the backbone chemotherapy could impact the consistency of the estimates of treatment-by-sex interaction. Indeed, (i) rhabdomyosarcoma patients in IRS-IV were younger than Ewing sarcoma patients from the other two trials, and (ii) all IRS-IV patients received four additional courses with cyclophosphamide after the first eight courses allocated by randomization; in contrast, all patients also received ifosfamide as induction chemotherapy before randomization in both Ewing sarcoma trials.

Our findings concerning acute toxicity are consistent with previous reports in sarcoma and lymphoma patients treated with alkylating agents.^{10–14} Differences in cytochrome P450 mediated drug metabolism between sexes could explain these results. Cyclophosphamide and ifosfamide are oxazaphosphorine alkylating prodrugs that are metabolized via different P450-catalyzed pathways: (i) 4-hydroxylation produces active alkylating agents and urotoxic acrolein via CYP2B6 for cyclophosphamide and CYP3A4 and CYP3A5 for

ifosfamide, and (ii) N-dechloroethylation generates inactive metabolites and nephro- and neurotoxic chloroacetaldehyde via CYP3A4 for cyclophosphamide and, to a much greater extent, CYP3A4 and CYP2B6 for ifosfamide.^{31–33} Greater activity of CYP3A4 and CYP2B6 has been reported in females resulting in higher concentrations of toxic chloroacetaldehyde after ifosfamide infusion and consequently in a possible higher risk of severe neurotoxicity in females.^{34–36} However, no cytochrome P450 related difference in hematologic toxicity between sexes has previously been reported.

In conclusion, our meta-analysis did not show that the treatment effect of cyclophosphamide versus ifosfamide is influenced by sex for either efficacy or toxicity. Therefore, recommending the choice of alkylating agent should not be based on sex in children and young adults treated for sarcoma. Additional studies would be useful for long-term follow-up including fertility outcomes.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by The Gustave-Roussy Institute; The Fondation pour la Recherche Médicale; European Community's Seventh Framework Programme under grant agreements no. 261474 (project ENCCA) and no. 602856-2 (project EEC); Fédération Enfants et Santé, Société Française de Lutte Contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent; Unicancer and the Ligue Nationale Contre le Cancer; Cancer Research UK (Grant No. CRUK/02/014); Deutsche Krebshilfe (Grants Nos. 50-2551-Jü3, 50-2551-Jü4, DKH-108128, 70-2551-Jue3, and 108128), Bundesministerium für Bildung und Forschung (TranSaRNet and Grants Nos. BMBF 01GM0869 and BMBF/Era-Net 01KT1310), and Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. 01GM0869; and the National Cancer Institute, Bethesda, MD (grant nos. U10CA180886, U10CA180899, U10CA098543, and U10CA098413). Special thanks for assistance to Joachim Boos for helpful discussions and Lorna Saint Ange for editing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Le Deley M-C, Paulussen M, Lewis I, et al. Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: Results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J Clin Oncol*. 2014;32:2440–2448.
- van den Berg H, Paulussen M, Le Teuff G, et al. Impact of gender on efficacy and acute toxicity of alkylating agent -based chemotherapy in Ewing sarcoma: Secondary analysis of the Euro-Ewing99-R1 trial. *Eur J Cancer*. 2015;51:2453–2464.
- Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, et al. Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:1174–82.
- Cook MB, McGlynn KA, Devesa SS, Freedman ND, Anderson WF. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:1629–1637.
- Khamly KK, Thursfield VJ, Fay M, et al. Gender-specific activity of chemotherapy correlates with outcomes in chemosensitive cancers of young adulthood. *Int J Cancer*. 2009;125:426–431.
- Molife R, Lorigan P, MacNeil S. Gender and survival in malignant tumours. *Cancer Treat Rev*. 2001;27:201–209.

7. Bartelink H, Roelofsens F, Eschwege F, et al. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: Results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J Clin Oncol*. 1997;15:2040–2049.
8. Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D, Adams R, et al. Prognostic factors for recurrence and survival in anal cancer: Generating hypotheses from the mature outcomes of the first United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Anal Cancer Trial (ACT I). *Cancer*. 2013;119:748–755.
9. Wakelee HA, Wang W, Schiller JH, et al. Survival differences by sex for patients with advanced non-small cell lung cancer on Eastern Cooperative Oncology Group trial 1594. *J Thorac Oncol*. 2006;1:441–446.
10. Collins M, Wilhelm M, Conyers R, et al. Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: Findings from a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2013;31:2303–2312.
11. Ferrari S, Palmerini E, Staals E, et al. Sex- and age-related chemotherapy toxicity in patients with non-metastatic osteosarcoma. *J Chemother*. 2009;21:205–210.
12. Paioli A, Luksch R, Fagioli F, et al. Chemotherapy-related toxicity in patients with non-metastatic Ewing sarcoma: Influence of sex and age. *J Chemother*. 2014;26:49–56.
13. Wrobel G, Mauguen A, Rosolen A, Reiter A, Williams D, Horibe K, et al. Safety assessment of intensive induction therapy in childhood anaplastic large cell lymphoma: Report of the ALCL99 randomised trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:1071–1077.
14. Juergens C, Weston C, Lewis I, et al. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47:22–29.
15. Franconi F, Campesi I. Pharmacogenomics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: Interaction with biological differences between men and women. *Br J Pharmacol*. 2014;171:580–594.
16. Anderson GD. Sex and racial differences in pharmacological response: Where is the evidence? Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *J Womens Health*. 2005;14:19–29.
17. Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*. 2009;76:215–228.
18. Schmetzer O, Flörcken A. Sex differences in the drug therapy for oncologic diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;411–442.
19. Stewart LA, Clarke MJ. Practical methodology of meta-analyses (overviews) using updated individual patient data. Cochrane Working Group. *Stat Med*. 1995;14:2057–2079.
20. Fisher DJ, Copas AJ, Tierney JF, Parmar MKB. A critical review of methods for the assessment of patient-level interactions in individual participant data meta-analysis of randomized trials, and guidance for practitioners. *J Clin Epidemiol*. 2011;64:949–967.
21. Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics*. 1954;10:101.
22. Higgins JPT. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003;327:557–560.
23. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet*. 1992;339:71–85.
24. Stewart LA, Clarke M, Rovers M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analyses of individual participant data: The PRISMA-IPD statement. *JAMA*. 2015;313:1657–1665.
25. Paulussen M, Craft AW, Lewis I, et al. Results of the EICESS-92 Study: Two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment—Cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol*. 2008;26:4385–4393.
26. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: Results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol*. 2001;19:3091–3102.
27. Bramwell VH, Mouridsen HT, Santoro A, et al. Cyclophosphamide versus ifosfamide: Final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23:311–321.
28. Buzdar AU, Legha SS, Tashima CK, et al. Ifosfamide versus cyclophosphamide in combination drug therapy for metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep*. 1979;63:115–120.
29. Nishida T, Sugiyama T, Yakushiji M. Cisplatin, epirubicin, and ifosfamide versus cisplatin, epirubicin, and cyclophosphamide in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol*. 1997;67:230.
30. Pawinski A, Tumolo S, Hoesel G, et al. Cyclophosphamide or ifosfamide in patients with advanced and/or recurrent endometrial carcinoma: A randomized phase II study of the EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;86:179–183.
31. Walker D, Flinois JP, Monkman SC, et al. Identification of the major human hepatic cytochrome P450 involved in activation and N-dechloroethylation of ifosfamide. *Biochem Pharmacol*. 1994;47:1157–1163.
32. Roy P, Tretyakov O, Wright J, Waxman DJ. Stereoselective metabolism of ifosfamide by human P-450s 3A4 and 2B6. Favorable metabolic properties of R-enantiomer. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1999;27:1309–1318.
33. Huang Z, Roy P, Waxman DJ. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:961–972.
34. Schmidt R, Baumann F, Hanschmann H, Geissler F, Preiss R. Gender difference in ifosfamide metabolism by human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2001;26:193–200.
35. Wolbold R, Klein K, Burk O, et al. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*. 2003;38:978–988.
36. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, et al. Hepatic CYP2B6 expression: Gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:906–922.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Fresneau B, Hackshaw A, Hawkins DS, Paulussen M, Anderson JR, Judson I, Litière S, Dirksen U, Lewis I, van den Berg H, Gaspar N, Gelderblom H, Whelan J, Boddy AV, Wheatley K, Pignon JP, De Vathaire F, Le Deley MC, and Le Teuff G. Investigating the heterogeneity of alkylating agents' efficacy and toxicity between genders: a systematic review and meta-analysis of randomized trials comparing cyclophosphamide and ifosfamide (MAIAGE study). *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64:e26457. doi: 10.1002/pbc.26457

A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Osteosarcoma Patients Treated With High-Dose Methotrexate: Data From the OS2006/Sarcoma-09 Trial

The Journal of Clinical Pharmacology
 2018, 58(12) 1541–1549
 © 2018, The American College of
 Clinical Pharmacology
 DOI: 10.1002/jcph.1252

Gabrielle Lui, PhD^{1,2,3}, Jean-Marc Treluyer, MD^{1,2,3,4}, Brice Fresneau, MD^{5,6}, Sophie Piperno-Neumann, MD⁷, Nathalie Gaspar, MD⁵, Nadège Corradini, MD⁸, Jean-Claude Gentet, MD⁹, Perrine Marec Berard, MD^{10,11}, Valérie Laurence, MD⁷, Pascale Schneider, MD¹², Natacha Entz-Werle, MD¹³, Hélène Pacquement, MD⁷, Frédéric Millot, MD¹⁴, Sophie Taque, MD¹⁵, Claire Freycon, MD¹⁶, Cyril Lervat, MD¹⁷, Marie Cécile Le Deley, PhD^{6,18}, Céline Mahier Ait Oukhatar¹⁹, Laurence Brugieres, MD⁵, Gwénaél Le Teuff, PhD^{6,18}, Naïm Bouazza, PhD^{1,3,4}, for the Sarcoma Group of UNICANCER

Abstract

Growing evidence suggests that polymorphisms of genes coding for transporters or enzymes may partially explain the large between subject variability reported for methotrexate (MTX) pharmacokinetics (PK). This prospective study aimed to develop a population PK-pharmacogenetic model to evaluate the part of between-subject variability due to single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in transporters and enzyme genes implicated in MTX distribution and elimination. MTX concentrations and 54 SNPs (located in *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCG2*, *SLC19A1*, *SLCO1B1*, and *UGT1A1* genes) were analyzed in patients treated with MTX included in the OS2006/sarcoma-09 trial (a multicenter, open-label, phase III trial, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00470223). PK data were analyzed using the nonlinear mixed-effect modeling software program Monolix. The influence of each SNP was evaluated using a stepwise procedure under additive, recessive, or dominant genetic model. The likelihood ratio test was used to test the effect of each SNP on PK parameters. Overall, 187 patients with 7898 MTX blood concentrations were included in the PK-pharmacogenetic analysis. A 2-compartment model adequately described the data. Although high-dose MTX dosing recommendations in pediatric patients are currently based on body surface area, body weight was more predictive of clearance between-subject variability than body surface area. The most significant polymorphism associated with MTX clearance was rs13120400 (on the *ABCG2* gene) under the recessive genetic model ($P < .0001$). GG genotype carriers for rs13120400 appeared to have a moderate decrease in MTX exposure compared to AA or GA carriers.

Keywords

methotrexate, osteosarcoma, pharmacogenetics, population pharmacokinetics

¹ EA 7323, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Paris, France

² Clinical Pharmacology Department, Cochin Hospital, Paris, France

³ CIC-1419 Inserm, Cochin-Necker, Paris, France

⁴ URC, Tarnier Hospital, France

⁵ Department of Children and Adolescents Oncology, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁶ Paris-Saclay University, CESP, INSERM, Villejuif, France

⁷ Medical Oncology Department, Institut Curie, Paris, France

⁸ Pediatric Oncology Department, Mother-Children Hospital, Nantes, France

⁹ Pediatric Oncology Department, La Timone Children's Hospital, Marseille, France

¹⁰ Pediatric Oncology Department, Institute of Pediatric Hematology and Oncology—Léon Bérard Anticancer Center, Lyon, France

¹¹ Oncology Department, Institut Curie, Paris, France

¹² Pediatric Hemato-Oncology Department, University Hospital, Rouen, France

¹³ Pediatric Oncology Department, CHU Hautepierre, Strasbourg, France

¹⁴ CIC-1402 INSERM, Poitiers, France

¹⁵ Department of Pediatric Hemato-Oncology, University Hospital, Rennes, France

¹⁶ Pediatric Department, The Child and Family Hospital, University Hospital, Grenoble, France

¹⁷ Pediatric Oncology Unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France

¹⁸ Biostatistics Unit, Gustave Roussy, Villejuif, France

¹⁹ UNICANCER Sarcoma Group, Paris, France

Submitted for publication 23 January 2018; accepted 8 April 2018.

Corresponding Author:

Naïm Bouazza, PhD, Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker Cochin, 89 rue d'Assas, 75006 Paris
 Email: naim.bouazza@aphp.fr

Osteosarcoma is a rare disease that affects children, adolescents, and young adults. A higher disease incidence occurs in patients aged between 10 and 20 years. The introduction of chemotherapy, especially those based on high dose methotrexate has improved osteosarcoma patients' prognosis with long-term survival rates increasing from <20% to 70%.¹ However, high dose methotrexate is potentially highly toxic. In osteosarcomas, several studies have shown that toxicity and efficacy were related to MTX pharmacokinetics (MTX-PK).²⁻⁴

MTX-PK has been extensively studied with large reported unexplained between subject variability despite normal renal function (from 12% to 45%).⁵⁻⁷ In several studies, body weight appeared to be the clinical covariate responsible for a part of MTX-PK variability⁵⁻⁹ despite high dose methotrexate dose is currently based on body surface area (BSA).

Growing evidence suggests that polymorphisms of genes coding for transporters or enzymes may partly be responsible for this MTX-PK variability.¹⁰ Several pharmacogenetic (PG) studies have correlated MTX-PK parameters and single-nucleotide polymorphisms (SNPs). In acute lymphoblastic leukemia (ALL), the nonsynonymous polymorphism G80A in *SCL19A1* gene, coding for an influx transporter, has been associated with plasma MTX concentrations, but this result is controversial.^{11,12} Furthermore, the polymorphism -24C>T on adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) C2 (*ABCC2*) is reported to be correlated to higher 48-hour postinfusion concentrations.¹³ In addition, a polymorphism on *ABCC4* has been associated to MTX plasma concentrations.¹⁴ Also, large cohorts and genome-wide association studies have shown that the organic anion transporter gene, *SLCO1B1*, is implicated in MTX clearance,^{15,16} whereas gene candidate studies have shown an impact of *ABCC2*.^{5,17} In addition to the influence of transporters, the enzyme *UGT1A1* has been suggested to affect MTX clearance. Kishi et al¹⁸ showed that average MTX clearance was lower (102.5 ± 24.0 mL/min/m²) among patients with the lower-activity *UGT1A1* 7/7 genotype than those with other *UGT1A1* genotypes (113.6 ± 24.9 mL/min/m²; $P = .028$). Furthermore, MTX clearance significantly predicted hyperbilirubinemia even after adjusting for *UGT1A1* genotype ($P = .024$). It was shown in a previous study that MTX can inhibit glucuronidation.¹⁹

Transporters affect not only MTX elimination but may also induce higher intracellular MTX concentration when their function is impaired; that may impact the toxicity and efficacy. SNPs located in *ABCC1* have been associated with toxicity. Similarly, SNPs in *ABCC4* and *SLCO1B1* correlated to toxicity,^{14,16,20} while SNPs in *ABCG2* are reported to predict efficacy

in psoriasis patients treated with low-dose MTX.²¹ All these SNPs may have an impact on MTX concentration, as the transporters are expressed in the entire organism, particularly in the kidney, and may contribute to MTX clearance.

The majority of these studies were performed in patients with ALL who require from 2 to 4 times lower doses than osteosarcoma patients. PG-PK studies in osteosarcoma are scarce: The SNPs in *SCL19A1*,²² in *ABCB1*, and *ABCC3*²³ may influence MTX concentrations and efficacy.^{24,25}

This prospective study aimed to develop a population PK model including genetics covariates, to investigate whether SNPs located in genes coding for transporters and enzymes may explain the between subject variability of MTX-PK in osteosarcoma.

Methods

Patients

The OS2006 trial was approved by a French ethics committee and performed in accordance with Good Clinical Practice guidelines. Before participating in the trial, all patients gave written informed consent for the trial, including this PK-PG study and the required genotyping. This ancillary PK-PG study was performed as part of the OS2006 trial (NCT00470223).²⁶ The OS2006 trial was a French multicenter, open-label, parallel group, phase III, randomized controlled trial that enrolled patients with newly diagnosed high-grade osteosarcoma. The trial assessed whether zoledronate combined with chemotherapy would improve event-free survival.

Chemotherapy Protocol

In the OS2006 trial, the chemotherapy allocated depended on the patient's age. Patients younger than 18 years were treated with an MTX-etoposide-ifosfamide regimen, patients aged between 18 and 25 years received either the M-EI regimen or an adriamycin-cisplatin-ifosfamide regimen, according to the physician's preference, and those older than 25 years received the adriamycin-cisplatin-ifosfamide regimen.²⁶ This PK-PG study concerned only patients treated with the MTX-etoposide-ifosfamide regimen (younger than 25 years old).²⁷ It is noteworthy that etoposide and ifosfamide were not coadministered with MTX but were given 8 days after the last infusion of MTX cure. All treatments and dosing have previously been reported.²⁶

MTX Administration and Blood Sampling

Two hours before MTX infusion, the patient began hydration with sodium bicarbonate (14%). The MTX infusion (12 g/m²) was started if the urinary pH was at least 7 and the urine flow reached 100 mL/m²/h. MTX (12 g/m²) was administered over 4 hours. MTX

concentration during each course of treatment was monitored by blood sampling every 24 hours until it dropped below $0.15 \mu\text{mol/L}$. The delay between administration and blood sampling, the dose administered, age, body weight, and height were recorded. Serum creatinine levels were available at diagnosis. After each course, renal toxicity was evaluated according to the common terminology criteria for adverse events (CTCAE version 3.0). Creatinine clearance was estimated using the Cockcroft-Gault formula for patients 18 years or older and using the modified Schwartz formula for patients younger than 18 years old.²⁸

Analytical Method

MTX therapeutic drug monitoring was routinely performed using the ARK methotrexate assay (ARK Diagnostic, Inc., Fremont, California), a homogeneous immunoassay by competition used with the AU 680 analyzer (Beckman Coulter, Brea, California). The lower limit of quantification was $0.02 \mu\text{mol/L}$.

Genotyping

The patients' DNA was extracted from dried blood spots according to a previously described method, a combination of 2 kits from Gensolve (London, England) and Qiagen (Hilden, Germany).²⁹ Briefly, DNA was extracted from the filter paper using Gensolve enzymes, then purified using QIAamp DNA mini kit columns. The DNA's quality and quantity were assessed by spectrophotometer (Nanodrop; ThermoScientific, Waltham, Massachusetts).

The genotyping concentrated on the main genes coding for transport proteins or enzymes related to MTX (ie, *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *SLCO1B1*, and *UGT1A1*). We selected tag SNPs capturing the common genetic variations of these 5 genes based on the variations identified for Europeans in the database of single-nucleotide polymorphisms.³⁰ We used the linkage disequilibrium tag SNP selection tool on the HapMap website, with the following parameters: (1) a minor allele frequency $>20\%$ and ii) a linkage disequilibrium threshold of $r^2 > 0.8$ to select the 42 most appropriate tag SNPs. In addition, the following SNPs were also included based on literature review: (1) rs1051266 (G80A) in *SLC19A1*¹¹; (2) rs4148737, rs1128503, in *ABCB1*; (3) rs4148416 in *ABCC3*^{24,25}; (4) rs9516519 in *ABCC4*; (5) rs3740065 in *ABCC2*¹⁴; (6) rs35592, rs28364006, rs11075291, rs3784862 in *ABCC1*; and (7) rs13120400, rs17731538 in *ABCG2*.²¹ Considering the size of our population, SNPs with a minor allele frequency $<10\%$ were not selected.

Finally, 54 SNPs were included in this analysis and were successfully genotyped (ADNid Company, Clapier, France) using VeraCodeTM technology from Illumina (San Diego, California). All of them were

in Hardy-Weinberg equilibrium with $P > .05$ with a call rate $>90\%$. We excluded from the PK-PG analysis patients with low-quality genotyping, that is, SNPs genotyped $<90\%$.

Population PK Modeling Strategy

Data were analyzed by a population approach using the nonlinear mixed-effect modeling software program Monolix version 4.1.3 (available at www.lixoft.eu). The model's parameters were estimated using the stochastic approximation expectation maximization algorithm combined to a Markov Chain Monte Carlo procedure.³¹

Several structural models were tested with 2 or 3 compartments and those with linear or nonlinear elimination, to estimate the PK parameters. Several error models (proportional, additive, and mixed) were tested to describe the residual variabilities (ϵ). The between subject variabilities were assumed to be exponential. The between-occasion variability (BOV) was also investigated.

The objective function value (OFV) was used to test the different hypotheses regarding the structural model, the structure of the variance-covariance matrix for between subject variability, and the residual variability models and the covariates effect(s) for PK parameters. The main population covariates of interest were age, weight, height, serum creatinine, BSA, and sex. Zoledronate coadministration was also tested as a categorical covariate on PK parameters. The effect of each patient's continuous covariate (CO) was systematically tested via generalized additive modeling on the basic model: for example, using clearance CL, $CL = \theta_{CL} \times \left(\frac{CO}{\text{median}(CO)}\right)^{\beta_{CO}^{CL}}$ where θ_{CL} is the typical value of clearance for a patient with the median covariate value and β_{CO}^{CL} is the coefficient associated to a CO. A forward inclusion ($P < .05$ and $\Delta\text{OFV} > 3.84$) and backward elimination ($P < .001$ and $\Delta\text{OFV} > 10.8$) approach was used to evaluate statistical significance of relevant covariates. A covariate was finally retained in the model if its effect was biologically plausible and if it produced any reduction in the variability of the PK parameter between subject variability.

Pharmacokinetic-Pharmacogenetic Model

Once the population PK model integrating the clinical and biological covariates was developed, the influence of the SNPs was evaluated one by one via a stepwise forward inclusion and backward deletion procedure (under additive, recessive, or dominant genetic models). The likelihood ratio test was used to test the effect of a given SNP on the PK parameter(s). An SNP was finally retained in the model if (1) it reduced the between subject variability, (2) the relative standard error coefficient corresponding to the effect was $<50\%$,

and (3) the likelihood ratio test was significant at 0.0001 level (to account for multiple testing issues considering the number of SNPs and the different genetic models tested). Genotype results were classified as AA, aA, or aa according to minor allele (a) carriage. The following equation was then used: for example, using clearance: $CL = \theta_{CL} + \beta_{CO} \times \text{geno}$.

For the additive model, $\text{geno} = 0, 1$ or 2 for AA, aA, and aa, respectively, according to the number of minor allele. For the recessive model, $\text{geno} = 0$ for both AA and aA genotypes, $\text{geno} = 1$ for aa genotype. For the dominant model, $\text{geno} = 0$ for AA genotype, $\text{geno} = 1$ for both aA and aa genotypes. β_{CO} is the estimated influential factor of the genotype.

Final Model Evaluation

For evaluation of the goodness of fit of the final PK-PG model, the following graphs were generated: observed and predicted concentrations versus time, observed concentrations versus population predictions, weighted residuals versus time, and weighted residuals versus predictions.

Similar graphs using individual predictive post hoc estimation were generated. The model was also assessed by normalized prediction distribution error metrics.³²

Drug concentration profiles were simulated using the final population PK-PG model and compared with the observed data to evaluate the predictive performance. Prediction-corrected visual checks were used as informative diagnostic tools to allow inspection of model appropriateness with time and across covariate values.³³

Results

Demographic Data

Of the 253 patients eligible for PK analysis, germline DNA was available for 191 patients. Four patients were excluded from this study because the quality of the genotyping was insufficient. Thus, data and blood samples from 187 patients were included in this PK-PG study. The study population consisted of 100 male patients and 87 female patients, with a median age of 14.2 years. Other baseline characteristics are shown in Table 1.

Blood Sampling and Treatment Data

The 187 patients provided 7898 MTX blood concentrations: with a mean number of samples per patient of 44 (range, 1-75). The median number of MTX courses available per patient was 13 (range, 1-20). The median number of samples per MTX course was 3 (range, 1-6). The median delay between MTX infusion and blood sampling was 48 hours (interquartile range, 24-72; range, 10-288).

Population PK

Six MTX blood concentrations were below the limit of quantification and were set to $0.01 \mu\text{mol/L}$, half of

Table 1. Baseline Characteristics of the 187 Patients Included in the Pharmacokinetic-Pharmacogenetic Analysis

Variable	Median (Interquartile Range)	Range
Age (y)	14.2 (11.4-16.5)	5.8-24.5
Height (cm)	162 (150-173)	110-203
Body weight (kg)	49 (38-61)	19-88
Body surface area (m^2)	1.5 (1.3-1.7)	0.8-2.2
Serum creatinine at diagnosis (mg/dl)	0.58 (0.45-0.7)	(0.29-1.15)
Creatinine clearance (mL/min per 1.73 m^2)	76.3 (64.1-94.3)	39.5-266.3
MTX dose (g/m^2)	12 (11.8-12.1)	9.6-13.5
	Number of Patients	Percentage
Age		
$\geq 18 \text{ y}$	25	13.4
$< 18 \text{ y}$	162	86.6
Sex		
Female	87	46.5
Male	100	53.5
Zoledronate coadministration	88	47.1

the limit of quantification. A 2-compartment model adequately described the data, with the following parameters: the clearance (CL), the central volume of distribution (V_c), the peripheral volume of distribution (V_p), and the intercompartmental clearance (Q). The proportional plus additive error model displayed a non-significant additive part, and thus residual variability was described by a proportional error model. The between subject variability was estimated for CL and V_c . Because blood samples were obtained at different MTX courses, the BOV on CL was estimated at 14.8% and on V_p at 25.2%. The weight-based allometric scaling of clearance and volume terms improved the goodness of fit and provided a significant drop in OFV by 147 units. Thus, body weight was the most significant covariate. The addition of BSA as covariate was not beneficial. Similarly, no additional drop in OFV was observed when age was included as an additional covariate. The coadministration of zoledronate did not significantly impact MTX clearance ($P = .47$) nor MTX central volume of distribution ($P = .11$) (ie, the 2 parameters with an estimated between subject variability).

Pharmacogenetic Analysis

The 54 SNPs included in the genetic analysis are detailed in Data file S1. These polymorphisms were tested on both MTX CL and V_c (ie, the 2 PK parameters with an estimated between subject variability).

In the initial stage of the PK-PG model-building the SNPs identified were tested one by one under additive, dominant, and recessive genetic models.

Four SNPs were significantly associated with MTX-PK CL ($P < .0001$) (Figure 1). Three of them were

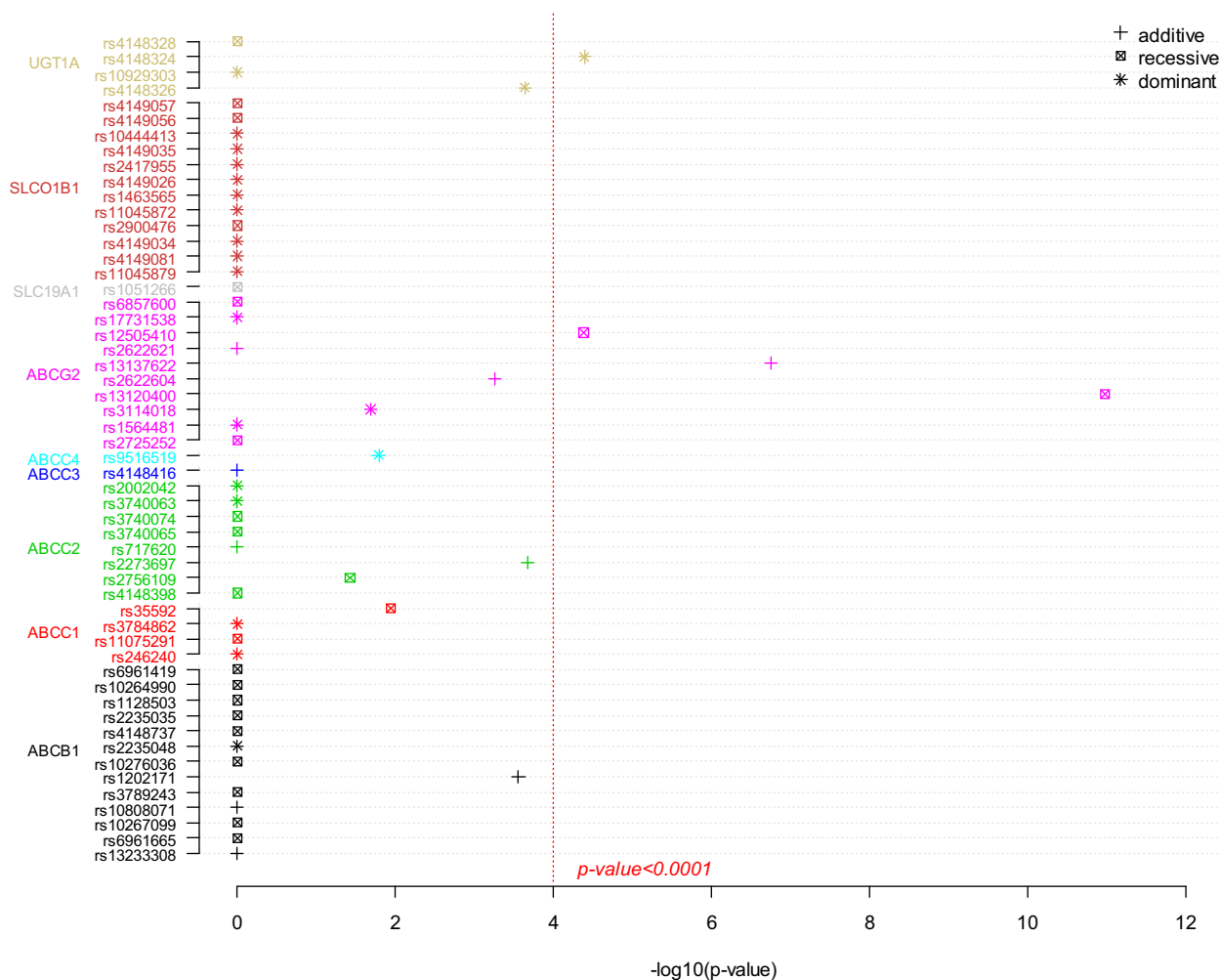


Figure 1. Association between methotrexate (MTX) clearance and the 54 SNPs included in the genetic analysis. For each SNP, the P value reported was the most significant among the 3 genetic models (additive, recessive, and dominant models).

localized on *ABCG2* gene (1) rs13120400 under the recessive model with a 16% increase in CL for GG genotype ($P < 10^{-10}$), (2) rs13137622 under the additive model with a 6% increase in CL per copy of the minor allele A ($P < 10^{-7}$), and (3) rs12505410 under the recessive model with a 12% increase in CL for GG genotype ($P < 10^{-8}$).

The fourth SNP was localized on the *UGT1A* gene (rs4148324) and was associated with both MTX CL ($P < 10^{-7}$ with a 9% decrease in CL for patients carrying at least one copy of allele G) and Vc ($P < 10^{-6}$ with a 6% decrease in Vc per copy of the minor allele G). Correlations between rs13120400 and both rs13137622 and rs12505410 in *ABCG2* were observed ($r^2 = 0.65$ and 0.69 , respectively). The SNP that produced the highest drop in OFV was rs13120400 under the recessive genetic model.

In the second stage, after inclusion of SNP rs13120400 into the PK-PG model, all other SNPs were tested on this model. However, none of them

provided a further significant drop in OFV. Inclusion of rs13120400 into the model reduced the between subject variability on CL by 1% to 2%. The GG genotype carriers for rs13120400 (12 of 187 patients, 6.4%) appeared to have a 16% increase on MTX CL compared to AA (104 patients, 55.6%) or GA (71 patients, 38%) carriers under the recessive genetic model. The mean (95% confidence interval) of MTX area under the plasma drug concentration–time curve from time zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$) for GG versus AA or GA genotype carriers was 2684 (1873–4200) $\mu\text{mol} \cdot \text{h/L}$ and 3250 (2016–5149) $\mu\text{mol} \cdot \text{h/L}$, respectively ($P = .007$). Final parameter estimates for the PK-PG model are presented in Table 2. Figure S1 shows the combined effect of body weight and rs13120400 status on MTX CL.

PK-PG Model Evaluation

The prediction-corrected visual check plot shows that the average prediction matches the observed concentration time-courses and that the variability is well

Table 2. Final Parameter Estimates of Pharmacokinetic-Pharmacogenetic Model

Parameter	Median	r.s.e (%)
Structural model		
CI for rs13120400 = {AA/GA} (L/h/70 kg)	15.4	3
CI for rs13120400 = {GG} (L/h/70 kg)	18	6
Vc (L/70 kg)	81.7	4
Q (L/h/70 kg)	0.18	5
Vp (L/70 kg)	4.96	5
Statistical model		
ω_{CI}	0.176	6
ω_{Vc}	0.201	5
γ_{CI}	0.148	2
γ_{Vp}	0.252	3
σ (%)	30.7	1

The typical parameters refers to a patient weighing 70 kg according to an allometric model: [Typical value] = [Typical parameter] * (body weight/70)^{PWR} where PWR = 0.75 for clearance and 1 for volume terms.
r.s.e, relative standard error (standard error of estimate / estimate*100); CI and Q, elimination and diffusional clearances; Vc and Vp central and peripheral volumes of distribution; σ residual proportional variability estimate; ω , between subject variability estimates; γ , between occasion variability estimates.

estimated for MTX (Figure 2D). The 5th, 50th, and 95th percentiles of the observed data are included in the 95% confidence interval of the 5th, 50th, and 95th simulated percentiles. Similarly, Figures 2 A, B, and

C show that the population and individual predictions match the observed concentrations and that the normalized prediction distribution error metrics are fairly distributed around zero.

Discussion

This is the first study that describes the population PK of high dose methotrexate in a large group of young patients with osteosarcoma that integrates genetic information. The broad spectrum of body weight allowed the investigation of the effect of growth on PK parameters. Different PK structural models (2 or 3 compartments) were tested. The 2-compartment model was finally retained as with previous PK studies performed in patients with osteosarcoma.^{6,7} PK parameters do not change proportionally to body mass, but introducing weight-based allometric scaling greatly improved the curve fitting. After accounting for body weight, no age effect was observed probably because no patients younger than 5 years old were included. The maturation effect observed on drug elimination clearance is usually complete at 5 years of age; after this, only growth effect driven by body weight is expected.^{34,35} Furthermore, although high dose methotrexate dosing recommendations in young patients are currently

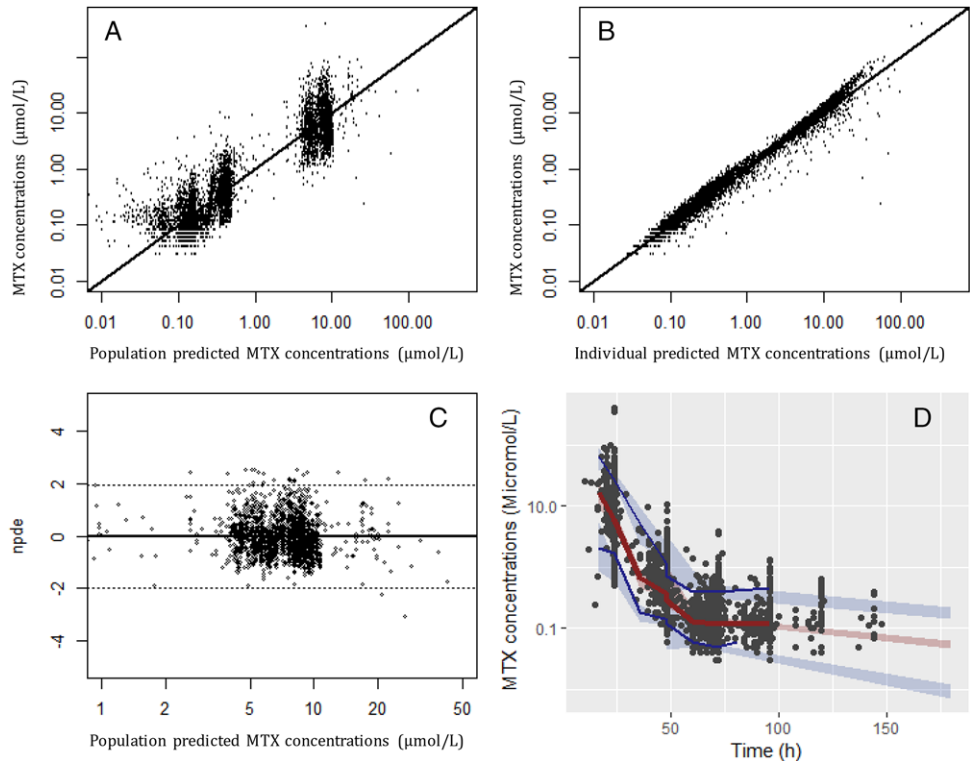


Figure 2. Diagnostic plots from the final model. Scatter plot of observed versus predicted concentrations (A). Observed versus individual predicted methotrexate concentrations (B). Normalized prediction distribution errors (npde) versus predicted concentrations (C). Prediction-corrected visual predictive check plots (D). The lines show the 5th, 50th, and 95th percentiles of observed data. The areas represent the 95% confidence interval around the simulated percentiles.

based on body surface area, body weight was the most significant covariate and explained a higher part of the between subject variability in PK parameters, as previously reported.⁶ All PK parameters (standardized for 70 kg) estimated from our final model were in the range of those previously reported by Johansson et al⁶ in a similar population of patients with osteosarcoma (CL, 17.6 versus 15.4 L/h/70 kg; V1, 74.3 versus 81.7 L/70 kg; V2, 4.1 versus 4.9 L/70 kg; Q, 0.11 versus 0.18 L/h/70 kg). We expect that renal function would affect MTX elimination CL. However, this could not be investigated in this study because serum creatinine was available only before the first MTX administration. This is an important limitation for our study. However, information about renal dysfunction following each course was collected, and grade 2 to 4 renal toxicities were described in less than 3% of patients.³⁶ In addition, high dose methotrexate administrations were postponed in the event of renal dysfunction. Furthermore, other covariates such as hydration, pH of urine, hematocrit, or hemoglobin were reported in some previous studies.^{8,9,37,38} However, these variables were not prospectively fully recorded in this study and could not be tested in our model. The number of MTX chemotherapy cycles before MTX infusion was tested was not significant in our model. However, a BOV on CL was found, suggesting that elimination parameters may vary across MTX courses. The BOV on CL was estimated to be 14.8%, in agreement with previous population PK models.^{6,7}

Among the 54 SNPs tested, 4 of them appeared to be highly associated with MTX pharmacokinetics in the initial stage of the genetic model building. These 4 SNPs crossed the prespecified level of significance ($P < .0001$) with an accurate estimation of the effect coefficient (relative standard error <50%). However, all these polymorphisms explained no more than 2% of the between subject variability on CL. Three of them (rs13120400, rs13137632, rs12505410) were located in *ABCG2* gene and the fourth (rs4148324) in *UGT1A* gene. Due to redundant information provided by the group of SNPs in linkage disequilibrium on *ABCG2*, inclusion of the most significant polymorphism (ie, rs13120400) in the model resulted in no additional SNPs significantly related to MTX PK. Therefore, only rs13120400 in the *ABCG2* gene (located in an intronic region) was retained in the final PK-PG model. The biological effect of this SNP has not been studied. It is located in a noncoding region, and no linkage disequilibrium with a nonsynonymous SNP located in a coding region has been shown. Interestingly, in a recent study Hegyi et al²³ also reported a correlation between polymorphisms of the *ABCG2* gene and MTX elimination half-life. Furthermore, it was shown that the rs13120400 was correlated to MTX efficacy in a

cohort of 340 patients with psoriasis.²¹ Studies in mice and humans have suggested that *ABCG2*, coding for the breast cancer resistance protein (BCRP) transporter has a major role in transporting MTX out of the liver and kidney.^{39,40} BCRP is a multidrug transporter expressed in many tissues,⁴¹ including the human kidney proximal tubule apical membrane.⁴² In our cohort, GG genotype carriers for rs13120400 appear to have a moderate decrease on MTX exposure compared to AA or GA carriers under a recessive genetic model. The impact of this polymorphism on treatment toxicity or efficacy needs to be investigated.

The polymorphisms selected in our study were mainly derived from studies in ALL where MTX doses and cotreatments differ from those used for osteosarcoma patients. Patients with ALL usually receive between 0.8 and 1 g/m² over 23 hours, or 2 g/m² over 4 hours.¹⁵ A higher dose of 5 g/m² may be used in other studies.^{5,13,17} This is still much lower than the 12 g/m² recommended for treating patients with osteosarcomas. The concomitant treatment used may also be of interest. In ALL, cytarabine, dexamethasone or other steroids, and mercaptopurine are often used.¹⁴ In osteosarcoma, ifosfamide or platinum-based drugs are frequently coadministered. Ifosfamide was shown to have an impact on pregnane X receptor (PXR; NR1I2) implicated in the gene regulation of several enzymes and transporter expression.⁴³ It has been shown in vitro that folate status may change transporters expression,⁴⁴ like multidrug-resistant proteins and in particular BCRP. Altogether, in our population the expression of BCRP and other multidrug-resistant proteins may differ from those in patients with ALL. The main MTX elimination route may therefore vary depending on the type of cancer and the treatments administered.

Conclusion

This PK-PG study included, for the first time, a large data set from a cohort of patients with osteosarcoma. Our results suggest that *ABCG2* may be related to MTX clearance with a moderate effect and explain only a small part of the between subject variability observed. Although high dose methotrexate dosing recommendations in pediatric patients are currently based on BSA, body weight was more predictive of clearance between subject variability than was BSA.

Funding

This study was sponsored by the Fondation pour la Recherche Médicale, French National Cancer Institute (INCa), Ligue Nationale contre le Cancer, Fédération Enfants et Santé, Société Française des Cancers et Leucémies de l'Enfant.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no conflict of interest.

References

- Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33(27):3029–3035.
- Graf N, Winkler K, Betlemovic M, Fuchs N, Bode U. Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1994;12(7):1443–1451.
- Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, et al. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer*. 2004;100(8):1724–1733.
- Aquerreta I, Aldaz A, Giráldez J, Sierrasesúmagu L. Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42(1):52–58.
- Simon N, Marsot A, Villard E, et al. Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(6):507–513.
- Johansson ÅM, Hill N, Perisoglou M, Whelan J, Karlsson MO, Standing JF. A population pharmacokinetic/pharmacodynamic model of methotrexate and mucositis scores in osteosarcoma. *Ther Drug Monit*. 2011;33(6):711–718.
- Colom H, Farré R, Soy D, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate after intravenous administration in pediatric patients with osteosarcoma. *Ther Drug Monit*. 2009;31(1):76–85.
- Nader A, Zahran N, Alshammaa A, Altaweel H, Kassem N, Wilby KJ. Population Pharmacokinetics of Intravenous Methotrexate in Patients with Hematological Malignancies: Utilization of Routine Clinical Monitoring Parameters. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;42(2):221–228.
- Comandone A, Passera R, Boglione A, Tagini V, Ferrari S, Cattel L. High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: clinical and pharmacokinetic results. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2005;44(4):406–411.
- Gervasini G. Polymorphisms in methotrexate pathways: what is clinically relevant, what is not, and what is promising. *Curr Drug Metab*. 2009;10(6):547–566.
- Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(10):3832–3834.
- de Deus DMV, de Lima ELS, Seabra Silva RM, Leite EP, Cartaxo Muniz MT. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T, A1298C, and G80A polymorphisms on the survival of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res Treat*. 2012;2012:292043.
- Liu Y, Yin Y, Sheng Q, et al. Association of ABCC2 –24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e82681.
- Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(2):53–61.
- Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, et al. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood*. 2013;121(6):898–904.
- Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(35):5972–5978.
- Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(5):468–476.
- Kishi S, Cheng C, French D, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*. 2007;109(10):4151–4157.
- Rajonarison JF, Lacarelle B, Catalin J, Durand A, Cano JP. Effect of anticancer drugs on the glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1993;21(5):823–829.
- Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, et al. Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(4):612–619.
- Warren RB, Smith RLL, Campalani E, et al. Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(8):1925–1929.
- Park JA, Shin HY. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. *Blood Res*. 2016;51(1):50–57.
- Hegyí M, Arany A, Semsei AF, et al. Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget*. 2017;8(6):9388–9398.
- Caronia D, Patiño-García A, Pérez-Martínez A, et al. Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. *PLoS One*. 2011;6(10):e26091.
- Yang J, Wang Z-G, Cai H-Q, Li Y-C, Xu Y-L. Effect of variation of ABCB1 and ABCC3 genotypes on the survival of bone tumor cases after chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;14(8):4595–4598.
- Piperno-Neumann S, Le Deley M-C, Rédini F, et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):1070–1080.
- Gaspar N, Occean B-V, Pacquement H, et al. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *Eur J Cancer Oxf Engl*. 1990. 2018;88:57–66.
- Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009;20(3):629–637.
- Ghantous A, Saffery R, Cros M-P, et al. Optimized DNA extraction from neonatal dried blood spots: application in methylome profiling. *BMC Biotechnol*. 2014;14:60.
- dbSNP Home Page. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/projects/SNP/>. Updated October 6, 2017. Accessed January 10, 2018.
- Kuhn E, Lavielle M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Data Anal*. 2005;49(4):1020–1038.
- Comets E, Brendel K, Mentré F. Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models: the npde add-on package for R. *Comput Methods Programs Biomed*. 2008;90(2):154–166.
- Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J*. 2011;13(2):143–151.
- Anderson BJ, Holford NHG. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:303–332.

35. Foissac F, Bouazza N, Valade E, et al. Prediction of drug clearance in children. *J Clin Pharmacol*. 2015;55(7):739–747.
36. Gaspar N, Occean B-V, Pacquement H, et al. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;88:57–66.
37. Dupuis C, Mercier C, Yang C, et al. High-dose methotrexate in adults with osteosarcoma: a population pharmacokinetics study and validation of a new limited sampling strategy. *Anticancer Drugs*. 2008;19(3):267–273.
38. Zhang W, Zhang Q, Tian X, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate after intravenous administration in Chinese osteosarcoma patients from a single institution. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(1):111–118.
39. Vlaming MLH, van Esch A, van de Steeg E, et al. Impact of abcc2 [multidrug resistance-associated protein (MRP) 2], abcc3 (MRP3), and abcg2 (breast cancer resistance protein) on the oral pharmacokinetics of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2011;39(8):1338–1344.
40. Vlaming MLH, van Esch A, Pala Z, et al. Abcc2 (Mrp2), Abcc3 (Mrp3), and Abcg2 (Bcrp1) are the main determinants for rapid elimination of methotrexate and its toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(12):3350–3359.
41. Caetano-Pinto P, Jamalpoor A, Ham J, et al. Cetuximab prevents methotrexate-induced cytotoxicity in vitro through epidermal growth factor dependent regulation of renal drug transporters. *Mol Pharm*. 2017;14(6):2147–2157.
42. Huls M, Brown CDA, Windass AS, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int*. 2008;73(2):220–225.
43. Harmsen S, Meijerman I, Febus CL, Maas-Bakker RF, Beijnen JH, Schellens JHM. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(4):765–771.
44. Lemos C, Kathmann I, Giovannetti E, et al. Cellular folate status modulates the expression of BCRP and MRP multidrug transporters in cancer cell lines from different origins. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(3):655–664.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Titre : Analyses pronostiques en oncologie pédiatrique : Identification de facteurs thérapeutiques, tumoraux ou constitutionnels associés à l'efficacité ou à la toxicité des traitements anticancéreux

Mots clés : cancer de l'enfant, susceptibilité génétique, efficacité, toxicité aiguë, interaction gène traitement, marqueurs

Résumé : Les progrès thérapeutiques en oncologie pédiatrique ont permis une amélioration des taux de survie qui dépassent aujourd'hui 80%. De façon à augmenter les taux de guérison et diminuer les complications et séquelles des traitements, des efforts collaboratifs internationaux ont permis le développement de protocoles thérapeutiques stratifiés sur les facteurs pronostiques majeurs incluant des facteurs biologiques tumoraux issus des analyses moléculaires et notamment génomiques. Cependant, si les traitements utilisés prennent de plus en plus en compte la biologie tumorale, leur adaptation aux facteurs individuels reste marginale.

La thèse ici présentée cherche à mieux comprendre comment les caractéristiques tumorales et individuelles des patients modifient l'efficacité et la toxicité des thérapeutiques anticancéreuses utilisées en oncologie pédiatrique.

Plusieurs travaux ont été réalisés :

1- Etude de l'impact pronostique des facteurs tumoraux : évaluation de l'impact pronostique de la décroissance du marqueur tumoral alphafoetoprotéine (AFP) dans les tumeurs germinales malignes de l'enfant et de l'adolescent traitées par chimiothérapie ;

2- Etude de l'impact pronostique des facteurs constitutionnels : (i) évaluation de l'effet du sexe sur l'efficacité et la toxicité des agents alkylants ; (ii) évaluation de l'impact pronostique de polymorphismes génétiques de gènes impliqués dans le métabolisme du méthotrexate sur l'efficacité et/ou la toxicité du méthotrexate haute dose dans le traitement de l'ostéosarcome ;

3- Etude des facteurs de risque de toxicité tardive : analyse de la toxicité auditive sévère dans la cohorte des survivants à long terme de cancers pédiatriques (FCCSS).

Title : Prognostic analyzes in pediatric oncology: Identification of therapeutic, somatic or constitutional related factors associated with the efficacy or toxicity of cancer treatments

Keywords : childhood cancer, genetic susceptibility, efficacy, acute toxicity, gene-treatment interaction, tumor markers

Abstract : Therapeutic advances in pediatric oncology have improved survival rates reaching over 80%. In order to increase cure rates and decrease complications and treatment sequelae, international collaborative efforts led to the development of therapeutic trials stratified on major prognostic factors including biological factors. However, treatment adaptation to individual patient characteristics remains marginal.

In this thesis, our objective was to better understand how somatic (tumor-related) and constitutional (patient-related) characteristics could modify efficacy and toxicity of anticancer therapies used in pediatric oncology.

Several works were performed:

1- Prognostic analysis of tumor markers: assessment of the alpha-foetoprotéine (AFP) decline prognostic value in childhood malignant germ cell tumors;

2- Prognostic analysis of constitutional factors: (i) assessment of the interaction between gender and type of alkylating agents on efficacy and acute toxicity; (ii) assessment of the efficacy and toxicity impact of genetic polymorphisms in patients with osteosarcoma treated with high-dose methotrexate;

3- Risk factors analysis of long-term toxicities: analysis of severe ototoxicity in the French Childhood Cancer Survivors Study (FCCSS).